

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

FRANCIELI CHASSOT

Influência da coagregação entre *Candida albicans* e *Lactobacillus acidophilus* sobre a capacidade de adesão da levedura em anel vaginal contraceptivo combinado (AVCC)

Maringá
2009

FRANCIELI CHASSOT

Influência da coagregação entre *Candida albicans* e *Lactobacillus acidophilus* sobre a capacidade de adesão da levedura em anel vaginal contraceptivo combinado (AVCC)

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 Biociências Aplicadas à Farmácia

Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientador: Prof^a Dr^a Márcia Edilaine Lopes Consolaro

Co-Orientador: Prof^a Dr^a Terezinha Inez Estivalet Svidzinski

Maringá
2009

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

Chassot, Francieli

C488i Influência da coagregação entre *Candida albicans* e *Lactobacillus acidophilus* sobre a capacidade de adesão da levedura em anel vaginal contraceptivo combinado (AVCC) / Francieli Chassot. -- Maringá : [s.n.], 2009.
40 f. : il.

Orientadora : Profa. Dra. Márcia Edilaine Lopes Consolaro.

Co-orientadora : Profa Dra Terezinha Inez Estivalet Svidzinski

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas, 2009.

1. Citologia clínica. 2. Micologia médica. 3. Candiase vulvovaginal. 4. NuvaRing®. 5. *Lactobacillus acidophilus*. I. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas.

Cdd 21.ed. 618.1507582

FOLHA DE APROVAÇÃO

FRANCIELI CHASSOT

Influência da coagregação entre *Candida albicans* e *Lactobacillus acidophilus* sobre a capacidade de adesão da levedura em anel vaginal contraceptivo combinado (AVCC)

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 Biociências Aplicadas à Farmácia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Profª Drª Márcia Edilaine Lopes Consolaro
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof. Drª. Cinthia Gandolfi Boer
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Drª. Eliana Valéria Patussi
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Drª. Sueli Fumie Ogatta
Universidade Estadual de Londrina

Aprovada em: 09 de janeiro de 2009.

Local de defesa: Auditório do Comcap, Bloco A 09, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos àqueles que acreditam que a ousadia e o erro são caminhos para as grandes realizações. Principalmente ao meu pai, Aloísio, e à minha mãe, Cinésia, que são exemplos de dignidade, perseverança, honestidade, força e amor ao próximo.

AGRADECIMENTOS

A todos que estiveram ao meu lado e que participaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho. Para vocês, ofereço este espaço...

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me proporcionado a vida, por me conduzir e iluminar meu caminho, me dando paz, saúde, sabedoria, esperança e alegrias.

Aos meus pais, Aloísio Enori Chassot e Cinésia Teresinha Chassot, e à minha família, agradeço pelo imenso amor, compreensão, respeito, ensinamentos e educação.

A minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Márcia Edilaine Lopes Consolaro, pela sua dedicação, competência, profissionalismo e pela confiança em mim depositada.

A Prof^ª. Dr^ª. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski, pela co-orientação, pela dedicação, pela forma “apaixonada” que transmite o conhecimento e principalmente por ter despertado o interesse pela área acadêmica. Obrigada pelo carinho e amizade.

As minhas irmãs Daici, Tatiane e Janaíne, à minha sobrinha Amanda, pelo amor, pela força e sentimento que nos une, pelo carinho e amizade.

Ao Pedro D. Teodoro de Oliveira, pelo seu amor, pelo seu apoio incondicional, pela paciência e compreensão nos momentos difíceis.

As minhas amigas, Daiane Camacho e Simone Américo Etgeton, que me ajudaram desde o início, muito obrigada pela amizade, incentivo e apoio.

Aos Laboratórios de Citologia Clínica e de Micologia Médica do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá pela estrutura oferecida para o desenvolvimento deste trabalho.

As amigas do laboratório de Citologia Clínica da UEM, Cinthia Gandolfi Boer, Mary Mayumi Irie e Celina Shizue Yoshida pela amizade e apoio técnico e científico.

Aos amigos do Laboratório de Micologia Médica da UEM, Lilian Cristiane Baeza pelas sugestões e apoio científico. Eliana Guilhermetti e Paulo de Souza Vieira pelo carinho e ajuda sempre que precisei.

Aos meus amigos de “bancada” do Laboratório de Micologia Médica da UEM, em especial, Nathalie Kira Tamura, Ernesto Guilherme Kemmelmeier, Kelen Fátima Dalben Dota, Alessandra Ribeiro de Freitas, Thâmara Aline Bertoni, Cristiane Suemi Shinobu, Pedrina Gonçalves Vidigal e também pelos amigos de “bancada” do Laboratório de Citologia Clínica, Luciene C. Farias Paiva e Edilson Damke, pela motivação e companheirismo.

A secretaria do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas, em especial à Luciane, pela amizade, competência e profissionalismo.

A todos os docentes e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas pelos conhecimentos transmitidos.

Muito obrigada a todos!

Influência da coagregação entre *Candida albicans* e *Lactobacillus acidophilus* sobre a capacidade de adesão da levedura em anel vaginal contraceptivo combinado (AVCC)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a função da coagregação entre *Candida albicans* e *Lactobacillus acidophilus* sobre a capacidade de adesão da levedura em anel vaginal contraceptivo (AVCC) NuvaRing® em uma tentativa de entender o que ocorre no ambiente vaginal. Foram utilizados dois isolados vaginais de *Candida albicans* e uma cepa ATCC de *Lactobacillus acidophilus*. Concentrações pré-padronizadas dos microrganismos isolados e coagregados foram utilizadas nos ensaios de aderência ao AVCC e na determinação da hidrofobicidade de superfície celular (HSC). O número de leveduras e lactobacilos aderidos ao anel foi determinado através de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL). Foi realizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV) do coagregado em cultura líquida e da aderência dos microrganismos isolados e coagregados aderidos ao anel. Tanto *C. albicans* quanto *L. acidophilus* possuem elevada capacidade de adesão ao AVCC, sem diferenças entre os dois isolados da levedura ($p > 0,05$). A partir de 1 h de coagregação, houve uma elevação na capacidade de adesão das leveduras ($p < 0,001$), acompanhado de uma diminuição na adesão dos lactobacilos ($p < 0,001$). A MEV mostrou as características da coagregação e comprovou a adesão dos microrganismos isolados e coagregados ao AVCC. Não houve relação entre HSC dos coagregados e sua capacidade de adesão *in vitro* ao AVCC. Considerando que haja correlação destes achados com as condições *in vivo*, a utilização de probióticos à base de *L. acidophilus* ou a sua presença em uma microbiota vaginal não protegeriam da adesão de *C. albicans* ao anel.

Palavras chave: Aderência; Anel vaginal contraceptivo; *Candida albicans*; Candidíase vulvovaginal; Coagregação; *Lactobacillus acidophilus*.

Influence of co-aggregation between *Candida albicans* and *Lactobacillus acidophilus* on the adhesion capacity of the yeast to combined contraceptive vaginal ring (CCVR).

ABSTRACT

The purpose of this study was evaluate the function of the co-aggregation between *Candida albicans* and *Lactobacillus acidophilus* on the adhesion capacity of the yeast to NuvaRing[®] contraceptive vaginal ring (CCVR) in an attempt to understand what takes place in the vaginal environment. Two vaginal isolates of *C. albicans* and an ATCC strain of *L. acidophilus* were used. Pre-standardized concentrations of the isolated and co-aggregated microorganisms were employed on the CCVR adherence essays and on the determination of the cell surface hydrophobicity (CSH). The number of yeast and lactobacilli adhered to the ring was determined through colony-forming units per milliliter (CFU/mL). Scanning electron microscopy (SEM) of the liquid co-aggregate and of the adherence of the isolated and co-aggregated microorganisms to the ring was carried out. Both *C. albicans* and *L. acidophilus* have high adhesion capacity to the CCVR, without differences between the two isolates of the yeast ($p>0.05$). From one hour or more of co-aggregation, there was an increase in the adhesion capacity of the yeast ($p<0.001$), matched by a diminished adhesion of the lactobacilli ($p<0.001$). SEM demonstrated the characteristics of the co-aggregation and the adhesion of the isolated and co-aggregated microorganisms to the CCVR. There was no relation between CSH and co-aggregated microorganisms to the CCVR. Considering that there would be a correlation of these findings with the conditions *in vivo*, the use of probiotics based on *L. acidophilus* or its presence in the vaginal flora would not protect against the adhesion of *C. albicans* to the ring.

Keywords: Adherence; Contraceptive Vaginal Ring; *Candida albicans*; Vulvovaginal Candidiasis; Co-aggregation; *Lactobacillus acidophilus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1 Número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) de <i>C. albicans</i> 1 e 2 e <i>L. acidophilus</i> obtidas em ensaios de aderência <i>in vitro</i> sobre anel vaginal contraceptivo NuvaRing®	33
Figura 1 Microscopia eletrônica de varredura da suspensão de coagregado em meio líquido entre <i>C. albicans</i> e <i>L. acidophilus</i>	34
Figura 2 Microscopia eletrônica de varredura de <i>C. albicans</i> e <i>L. acidophilus</i> aderidos individualmente ao NuvaRing®.....	35
Figura 3 Microscopia eletrônica de varredura do coagregado de 4 h de <i>C. albicans</i> e <i>L. acidophilus</i> após incubação com NuvaRing®.....	36
Figura 4 Percentagem de hidrofobicidade de superfície celular (HSC) dos microrganismos testados nos ensaios de aderência.....	37

Dissertação elaborada e formatada
conforme as normas da publicação
científica: *Contraception Journal*.

Disponível em:

<http://www.contraceptionjournal.org/>

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I.....	13
1.1	Introdução.....	13
1.1.1	Candidíase Vulvovaginal.....	13
1.1.2	Eossistema vaginal.....	14
1.1.3	Anel vaginal contraceptivo (AVCC).....	15
1.1.4	Aderência das Leveduras.....	16
1.2	Justificativa.....	17
1.3	Objetivos.....	18
1.3.1	Objetivos gerais.....	18
1.3.2	Objetivos específicos.....	18
1.4	Referências Bibliográficas.....	19
2	CAPÍTULO II.....	22
2.1	Influência da coagregação entre <i>Candida albicans</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> sobre a capacidade de adesão da levedura em anel vaginal contraceptivo combinado (AVCC).....	23
3	CAPÍTULO III.....	38
3.1	Conclusões.....	38
3.2	Perspectivas futuras.....	39

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Candidíase vulvovaginal

Candidíase vulvovaginal (CVV) é um distúrbio ocasionado pelo crescimento anormal de leveduras na mucosa do trato genital feminino. Trata-se de uma infecção de vulva e vagina, causada por leveduras que habitam normalmente a mucosa vaginal, mas que podem tornar-se patogênicas quando o sítio de colonização do hospedeiro passa a ser favorável para o seu desenvolvimento (ZIARRUSTA, 2002). De 80 a 90% dos casos são devido à *Candida albicans*, e de 10 a 20% a outras espécies denominadas *Candida* não-*albicans* (*C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis*, *C. lusitania*). *C. glabrata* é a segunda espécie em frequência nas CVV (PICOVA et al., 2001). Porém, leveduras de outros gêneros também podem causar esta infecção, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula* sp e *Trichosporon* sp (CONSOLARO et al., 2004).

A CVV é um dos diagnósticos mais frequentes na prática diária em ginecologia, representando de 20 a 25% dos corrimentos vaginais de natureza infecciosa, sendo a primeira causa de vulvovaginite na Europa e segunda nos Estados Unidos e no Brasil, onde é precedida pela vaginose bacteriana (ZIARRUSTA, 2002; CORSELLO et al., 2003). Cavalcante et al. (2005) reforçam em seu estudo a necessidade de valorizar a doença como importante causa de comprometimento da saúde da mulher. Estima-se que aproximadamente 75% das mulheres adultas apresentem pelo menos um episódio em sua vida, sendo que destas, 40 a 50% vivenciarão novos surtos e 5% atingirão o caráter recorrente (CVVR) (NARDIN et al., 2000).

Esta infecção caracteriza-se por prurido, ardor, dispareunia e pela eliminação de um corrimento vaginal em grumos, semelhante à nata de leite. Com frequência, a vulva e a vagina encontram-se edemaciadas e hiperemiadas, algumas vezes acompanhadas de ardor ao urinar e sensação de queimadura (SOBEL, 1990). As lesões podem estender-se pelo períneo, região perianal e inguinal. O corrimento, que geralmente é branco e espesso, é inodoro e, quando depositado nas vestes a seco, tem aspecto farináceo. Em casos típicos, nas paredes vaginais e no colo uterino aparecem

pequenos pontos branco-amarelados. Os sintomas se intensificam no período pré-menstrual, quando a acidez vaginal aumenta (SALVATORE, 1980).

A principal fonte de leveduras vaginais é o trato gastrointestinal. Por um processo chamado transmissão endógena, as mesmas são veiculadas para a vagina por auto-inoculação, onde se adaptam e se desenvolvem. A transmissão sexual também é aceita, o que torna a CVV uma doença sexualmente transmissível (DST). Pela ação de enzimas como proteases e hidrolases, as leveduras que chegam à vagina penetram no seu epitélio superficial, ali permanecendo albergadas, podendo causar distúrbios imediatos ou constituir-se em reservatório para reinfecções posteriores (FIDEL e SOBEL, 1996).

Do ponto de vista do hospedeiro, a colonização prévia por levedura e posterior diminuição da capacidade de resposta imunológica observada em doenças imunossupressoras, em gestantes e usuárias crônicas de corticóides, parecem favorecer a infecção. Ainda parecem contribuir o uso de antibióticos, estrogenerioterapia, pequenos traumas como o ato sexual, hábito de usar roupas muito justas ou de fibras sintéticas, além da dieta alimentar muito ácida (FERNANDES e MACHADO, 1996; NARDIN et al., 2000). Raramente isola-se *Candida* na pré-menarca, fato este que associado à baixa prevalência de CVV na menopausa, enfatizam a dependência hormonal da infecção (FERRER, 2000).

Ecossistema vaginal

O ecossistema vaginal abriga uma microbiota que tem sido cada vez mais reconhecida como protetora contra patógenos. Os lactobacilos são dominantes neste habitat, em torno de 10^7 a 10^8 unidades formadoras de colônias (UFC/ml) no fluido vaginal em mulheres pré-menopausadas saudáveis (SOBEL, 1996). Entre eles, *Lactobacillus acidophilus* e *L. fermentum* são os mais freqüentemente isolados, embora outros, como *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. jensenii*, *L. casei*, *L. delbrueckii* e *L. salivaris* também sejam isolados (REDONDO-LOPEZ et al., 1990).

A microbiota vaginal normal é, portanto, rica em lactobacilos produtores de peróxido (bacilos de Döderlein), os quais formam ácido láctico a partir do glicogênio, presente principalmente no citoplasma das células escamosas do tipo intermediárias do epitélio vaginal, cuja produção é estimulada pelos hormônios sexuais femininos. Esse mecanismo propicia uma acidez adequada do ambiente vaginal (pH em torno de 4,5),

dificultando a proliferação da maioria dos patógenos, com exceção das leveduras, que proliferam em ambiente ácido (ALMEIDA FILHO et al., 1995). Alguns autores descrevem que a microbiota lactobacilar parece constituir uma barreira defensiva frente a CVV, devido a sua possível atuação em três diferentes níveis. Em primeiro lugar, competindo com os fungos pelos nutrientes. Em segundo, realizando um processo de coagregação com *C. albicans*. Estudos *in vivo* com pacientes saudáveis já demonstraram que lactobacilos também coagregam com outros componentes da microbiota vaginal e patógenos potenciais (NARDIN et al., 2000). Foi proposto que este processo seria uma das formas dos lactobacilos neutralizarem microrganismos patogênicos, mantendo o balanço ecológico e inibindo o desenvolvimento de infecções (HAZEN et al., 2001). A coagregação pode impedir o acesso de patógenos à receptores celulares e inibir a sua adesão, que é fundamental para a colonização e desenvolvimento de microrganismos como *C. albicans* (FERNANDES e MACHADO, 1996). Estudos *in vivo* apontam que o uso de *Lactobacillus acidophilus* pode auxiliar no controle de infecções urogenitais (IRIE et al., 2006) e na proteção contra infecção anal e oral por *C. albicans* em ratas (MULDERS et al., 2002). Em terceiro, são capazes de produzir substâncias (bacteriocinas) capazes de inibir a formação de pseudo-hifas (ZIARRUSTA, 2002).

Anel vaginal contraceptivo (AVCC)

Desde a introdução dos contraceptivos hormonais no início da década de 60, os contraceptivos orais combinados (ACO) se tornaram o método de escolha para várias mulheres no mundo todo (STONE, 1995). Os ACO são produtos baseados na redução das dosagens de estrogênios e progestágenos, são eficazes e apresentam bom controle hormonal do ciclo, além de ótimo perfil de tolerabilidade (ROUMEN et al., 2001). Porém, apresentam algumas desvantagens, uma vez que são administrados oralmente precisam passar pelo trato gastrointestinal e pelo fígado, sendo portanto, expostos ao metabolismo hepático de primeira passagem. Podem ter também absorção reduzida, em consequência de vômitos ou interações alimento-medicamento, podendo levar a níveis plasmáticos mais baixos (ROSENBERG et al., 1998).

Estas evidências clínicas mostraram a necessidade do desenvolvimento de métodos alternativos de contracepção hormonal e conduziram ao desenvolvimento de anéis vaginais anticoncepcionais (ODDSSON et al., 2005). O NuvaRing[®] (Organon USA Inc., Roseland, NJ) é um anel feito de evatane, copolímero de etileno, com

diâmetro externo de 54 mm e espessura de 4 mm, que libera 15 µg de etinilestradiol (EE) e 120 µg de etonogestrel (ENG) por dia. Cada anel é destinado a um ciclo de uso compreendendo três semanas (MULDERS et al., 2002). Trata-se de um contraceptivo com excelente controle de ciclo, pode ser inserido e removido com facilidade pela própria usuária e apresenta ótimo perfil de segurança. Dados farmacodinâmicos mostraram completa inibição da ovulação durante o seu uso. Após a interrupção da sua utilização, há um rápido retorno aos ciclos normais. Em caso de esquecimento da remoção do anel, o mesmo continua a inibir a ovulação por mais uma semana, reforçando a sua excelente eficácia (ROUMEN et al., 2001). Durante um grande estudo de eficácia e tolerabilidade, 13,7% das mulheres usuárias do anel contraceptivo informaram a presença de vaginite, embora apenas 5% acreditassem que a mesma estava relacionada ao tratamento (VERHOEVEN et al., 2004).

As mulheres que fazem uso de ACO têm uma taxa mais alta de CVV (SOBEL et al., 1998; RINGDAHL, 2000), uma vez que o estrogênio possui uma ação direta tanto nas células da hospedeira quanto nas leveduras, favorecendo a infecção conforme os mecanismos a seguir: a) células de *Candida* apresentam receptores para estrogênio que, quando estimulados pelas altas concentrações hormonais, implicam no aumento da colonização vaginal e da proliferação fúngica (CONSOLARO et al., 2004); b) o hormônio estimula a maturação das células do epitélio pluriestratificado escamoso vaginal, às quais *C. albicans* apresenta grande capacidade de adesão (CORSELLO et al., 2003); c) o epitélio maduro produz grandes quantidades de glicogênio, que é um substrato para *C. albicans*; d) esta grande quantidade de glicogênio mantém o pH vaginal muito ácido durante todo o período de uso dos ACO, que é propício ao desenvolvimento de leveduras (CORSELLO et al., 2003).

Esses mecanismos podem também estar relacionados ao uso do AVCC. Além disso, CAMACHO et al. (2007) relataram em seus estudos a ocorrência de adesão de leveduras ao AVCC *in vitro*, o que poderia auxiliar na manutenção da levedura na vagina, favorecendo também a infecção.

Aderência das leveduras

A patogenicidade de um microrganismo é definida como a sua capacidade de determinar doença, sendo esta mediada por múltiplos fatores (GHANNOUM e RADWAN, 1990). A virulência das espécies patogênicas de *Candida* depende de vários fatores, tais como a adesão a substratos inertes e biológicos, formação de tubo

germinativo com conseqüente desenvolvimento da forma filamentosa, variabilidade genotípica, produção de toxinas e enzimas extracelulares hidrolíticas, variabilidade antigênica, imunomodulação dos mecanismos de defesa do hospedeiro e hidrofobicidade da superfície celular (CALDERONE e FONZI, 2001). A expressão de hidrofobicidade de superfície celular (HSC) por *C. albicans* tem sido correlacionada com virulência aumentada, provavelmente por estimular fenômenos de aderência, resistência à fagocitose e germinação (HAZEN et al., 2001).

A aderência é considerada um dos mais importantes fatores de virulência de *Candida* spp, sendo o primeiro estágio para a colonização dessas leveduras em diversas partes do organismo do hospedeiro (HAZEN et al., 2001). A ligação de *C. albicans* a superfícies mucosas tem sido mostrada como um importante passo no processo infeccioso, particularmente na cavidade oral e mucosa vaginal (JABRA-RIZKI et al., 2001). Devido a sua importância vários estudos *in vivo* e *in vitro* têm sido desenvolvidos para avaliar e semi-quantificar a aderência de *C. albicans* a superfícies celulares e inanimadas (JABRA-RIZKI et al., 2001; SHIN et al., 2002; IRIE et al., 2006; CAMACHO et al., 2007).

Uma outra forma de estudar a aderência de um microrganismo é avaliar a sua capacidade de formar biofilmes, que constituem um outro tipo de aderência, na qual os microrganismos formam agregados unicelulares, gerando estruturas multicelulares que aderem a superfícies. Sua formação ocorre em resposta a uma variedade de condições, incluindo alta densidade celular, privação de nutrientes e estresse físico ambiental (WATNICK e KOLTER, 2000; DOUGLAS, 2003).

A formação de biofilme em dispositivos médicos implantados tem sido motivo de preocupação, pois uma vez estabelecido o biofilme há o aumento do risco de desenvolvimento de infecções, já que ele funciona como um reservatório de microrganismos e está associado a altos níveis de resistência aos agentes antimicrobianos (DUNNE, 2002).

JUSTIFICATIVA

O AVCC é um corpo estranho inserido em um ecossistema complexo, composto por diferentes espécies bacterianas e leveduras, que são isoladas da vagina de 20-25% das mulheres adultas saudáveis. O equilíbrio desse ecossistema pode ser rompido pelo

uso do AVCC, desencadeando uma predisposição para o desenvolvimento de CVV e CVVR. Confirmando estes dados, já foi estabelecida a ocorrência de adesão *in vitro* de leveduras ao AVCC, o que representaria um reservatório do agente, favorecendo assim a ocorrência da infecção.

Porém, as condições experimentais *in vitro* utilizadas na maioria dos experimentos são muito diferentes e bem menos complexas do que aquelas encontradas no ecossistema natural, onde há predominância de lactobacilos sobre os demais microrganismos. A ocorrência de coagregação entre *C. albicans* e *Lactobacillus acidophilus* já foi comprovada e possui grande importância na manutenção do microambiente vaginal, principalmente por reduzir a adesão da levedura ao epitélio vaginal. Porém, pouco se sabe sobre a função da coagregação na adesão à superfícies inertes, como é o caso do AVCC, e sua influência na CVV decorrente do uso do anel.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o papel da coagregação entre *C. albicans* e *Lactobacillus acidophilus* sobre a capacidade de adesão da levedura em AVCC NuvaRing® em uma tentativa de entender o que ocorre no ambiente vaginal.

Objetivos específicos

1. Avaliar a capacidade de aderência de *C. albicans* e também de *Lactobacillus acidophilus* ao AVCC separadamente através da técnica de contagem de colônias em placas, após período de incubação de 1 hora, e também por microscopia eletrônica de varredura (MEV);
2. Demonstrar a ocorrência da co-agregação entre *C. albicans* e *Lactobacillus acidophilus* e suas características em cultivos líquidos através da MEV;
3. Avaliar a aderência ao AVCC de *C. albicans* e *Lactobacillus acidophilus* após a coagregação de 1 h e 4 h através da técnica de contagem de colônias em placas e também pela MEV;
4. Determinar a influência da hidrofobicidade de superfície celular de *C. albicans*, de *Lactobacillus acidophilus* e do coagregado na aderência ao AVCC.

Referências Bibliográficas:

1. ALMEIDA FILHO G.L.; PASSOS M.R.L.; GOUVÊA T.V.D. Candidíase. *In*: PASSOS M R L. **Doenças sexualmente transmissíveis**. 4a.ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1995.
2. CALDERONE R. A.; FONZI W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends Microbiol.** v. 9, n.7, p. 327-335, 2001.
3. CAMACHO D.P.; CONSOLARO M.E.L.; PATUSSI E.V.; DONATTI L.; GASPARETTO A.; SVIDZINSKI T.I.E.. Vaginal yeast adherence to the combined contraceptive vaginal ring (CCVR). **Contraception.** v. 76, p. 439-443, 2007.
4. CAVALCANTE V.L.N.; MIRANDA A.T.; PORTUGAL G.M.P. Rastreamento de candidose vaginal durante a prevenção do câncer cérvico-uterino. **DST- J Bras Doenças Sex Transm.** v.17, p. 44-8, 2005.
5. CONSOLARO M.E.L.; ALBERTONI T.A.; YOSHIDA C.S.; MAZUCHELI J.; PERALTA R.M.; SVIDZINSKI T.I.E. Correlation of *Candida* species and symptoms among patients with vulvovaginal candidiasis in Maringá, Paraná, Brazil. **Rev Iberoam Micol.** v. 21, p. 202-05, 2004.
6. CORSELLO S.; SPINILLO A.; OSNENGO A. An epidemiological survey of vulvovaginal candidiasis in Italy. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.** v. 110, p. 66-72, 2003.
7. DOUGLAS J.L. *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends Microbiol.** v. 11, p. 30-36, 2003.
8. DUNNE W.M. Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? **Clin Microbiol Rev.** v. 15, p. 155-166, 2002.
9. FERNANDES C.E.; MACHADO, R.B. Aspectos etiopatogênicos, diagnósticos e terapêuticos da candidíase vulvovaginal. **Rev Bras Medicin.** v. 7, p. 100-104, 1996.
10. FERRER J. Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. **J Gynaecol Obstet.** v. 7, p. 21-27, 2000.
11. FIDEL J.R; SOBEL J.D. Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. **Rev Clin Microbiol.** v. 9, p. 335-48, 1996.

12. GHANNOUM M.A.; RADWAN S.S. *Candida* adherence to epithelial cells. Boca Raton: CRC Press, Inc, 1990.
13. HAZEN K.C.; WU J.G.; MASUOKA J. Comparison of hydrophobic properties of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. **Infect Immun.** v. 69, p. 779-786, 2001.
14. IRIE M.M.T.; CONSOLARO M.E.L.; GUEDES T.A.; DONATTI L.; PATUSSI E.V.; SVIDZINSKI T.I.E. A simplified technique for evaluating the adherence of yeasts to human vaginal epithelial cells. **J Clin Lab Anal.** v.20, p.195-203, 2006.
15. JABRA-RIZKI M.A.; FALKER W.A.; MERZ W.G.; BAQUI A.A.M.A.; KELLEY J.I.; MEILLER T.F. Cell surface hydrophobicity - associated adherence of *Candida dubliniensis* to human buccal epithelial cells. **Rev Iberoam Micol.** v. 18, p. 17-22, 2001.
16. MULDER T.M.T.; DIEBEN T.O.M.; BENNINK H.J.T.C. Ovarian function with a novel combined contraceptive vaginal ring. **Hum Reprod.** v. 17, p. 2594-9, 2002.
17. NARDIN M.E.; MORANO S.; AHUMADA C.; VOLTA G.; FERNANDES S.; MENDES E. Prevalencia de la candidiasis vulvovaginal y su relacion con algunos factores de riesco. **Rev Arg Micol**, 2000.
18. ODDSSON K.; LEIFELS-FISCHER B.; MELO N.R.; WIEL-MASSON D.; BENEDETTO C.; VERHOEVEN C.H.J.; DIEBEN T.O.M. Efficacy and safety of a contraceptive vaginal ring (NuvaRing) compared with a combined oral contraceptive: a 1-year randomized trial. **Contraception.** v. 71, p. 176-182, 2005.
19. PICHOVÁ I.; PAVLICKOVÁ J.; DOSTÁL J.; DOLEJSI E.; HRUSKOVÁ-HEIDINGSFELDOVÁ O.; WEBER J.; RUMML T.; SOUCEK M. Secreted aspartic proteinases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*: inhibition with peptidomimetic inhibitors. **Eur J Biochem.** v. 268, p. 2669-2677, 2001.
20. REDONDO-LOPEZ V.; COOK R.L.; SOBEL J.D. Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. **Rev Infect Dis.** v. 12, p. 856-872, 1990.
21. RINGDAHL E.N. Treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis. **Am Fam Physician.** v. 61, p. 3306-3312, 2000.

22. ROSENBERG M.J.; WAUGH M.S.; BURNHILL M.S. Compliance, counseling and satisfaction with oral contraceptives: a prospective evaluation. **Fam Plann Perspect.** v.30, p. 89-92, 1998.
23. ROUMEN F.J.M.E.; APTER D.; MULDER T.M.T.; DIEBEN T.O.M. Efficacy, tolerability and acceptability of a novel contraceptive vaginal ring releasing etonogestrel and ethinyl oestradiol. **Hum Reprod.** v. 16, p. 469-475, 2001.
24. SALVATORE C.A. Candidiases vulvovaginal. *In* Lacaz, C.S. Candidiases. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1980.
25. SHIN J.H.; KEE S.J.; SHIN M.G.; KIM S.H.; SHIN D.H.; LEE S.K.; SUH S.P.; RYANG D.W. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. **J Clin Microbiol.** v. 40, p. 1244-1256, 2002.
26. SOBEL J.D. Vaginal infections in adult women. **Med Clin North Am.** v. 74, p. 1575-1602, 1990.
27. SOBEL J.D. Vaginitis and vaginal flora: controversies abound. **Curr Opin Infect Dis.** v. 9, p. 42-47, 1996.
28. SOBEL J.D.; FARO S.; FORCE R.W.; FOXMAN B.; LEDGER W.J.; NYIRJESY P.R. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. **Am J Obstet Gynecol.** v. 178, p. 211, 1998.
29. STONE S.C. Desogestrel. **Clin Obstet Gynecol.** v. 38, p. 821-8, 1995.
30. VERHOEVEN C.H.J.; VAN DEN HEUVEL M.W.; MULDER T.M.T.; DIEBEN T.H.O.M. The contraceptive vaginal ring, NuvaRing®, and antimycotic comedication. **Contraception.** v. 69, p. 129-132, 2004.
31. ZIARRUSTA G. B. Vulvovaginitis candidiasica. **Rev Iberoam Micol.** v. 19, p. 22-24, 2002.
32. WATNICK P.; KOLTER R. Biofilm, city of microbes. **J Bacteriol.** v. 182, p.2675-2679, 2000.

CAPÍTULO II

Artigo: “INFLUÊNCIA DA COAGREGAÇÃO ENTRE *Candida albicans* E *Lactobacillus acidophilus* SOBRE A CAPACIDADE DE ADESÃO DA LEVEDURA EM ANEL VAGINAL CONTRACEPTIVO COMBINADO (AVCC).”

INFLUÊNCIA DA COAGREGAÇÃO ENTRE *Candida albicans* E *Lactobacillus acidophilus* SOBRE A CAPACIDADE DE ADESÃO DA LEVEDURA EM ANEL VAGINAL CONTRACEPTIVO COMBINADO (AVCC).

INFLUENCE OF CO-AGGREGATION BETWEEN *Candida albicans* AND *Lactobacillus acidophilus* ON THE ADHESION CAPACITY OF THE YEAST TO COMBINED CONTRACEPTIVE VAGINAL RING (CCVR).

Francieli Chassot^a, Daiane P. Camacho^b, Eliana Valéria Patussi^b, Lucélia Donatti^c,
Terezinha I. E. Svidzinski^b, Márcia E. L. Consolaro^{a*}

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a função da coagregação entre *Candida albicans* e *Lactobacillus acidophilus* sobre a capacidade de adesão da levedura em anel vaginal contraceptivo (AVCC) NuvaRing[®] em uma tentativa de entender o que ocorre no ambiente vaginal. Foram utilizados dois isolados vaginais de *Candida albicans* e uma cepa ATCC de *Lactobacillus acidophilus*. Concentrações pré-padronizadas dos microrganismos isolados e coagregados foram utilizadas nos ensaios de aderência ao AVCC e na determinação da hidrofobicidade de superfície celular (HSC). O número de leveduras e lactobacilos aderidos ao anel foi determinado através de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL). Foi realizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV) do coagregado em cultura líquida e da aderência dos microrganismos isolados e coagregados aderidos ao anel. Tanto *C. albicans* quanto *L. acidophilus* possuem elevada capacidade de adesão ao AVCC, sem diferenças entre os dois isolados da levedura ($p > 0,05$). A partir de 1 h de coagregação, houve uma elevação na capacidade de adesão das leveduras ($p < 0,001$), acompanhado de uma diminuição na

adesão dos lactobacilos ($p < 0,001$). A MEV mostrou as características da coagregação e comprovou a adesão dos microrganismos isolados e coagregados ao AVCC. Não houve relação entre HSC dos coagregados e sua capacidade de adesão *in vitro* ao AVCC. Considerando que haja correlação destes achados com as condições *in vivo*, a utilização de probióticos à base de *L. acidophilus* ou a sua presença em uma microbiota vaginal não protegeriam da adesão de *C. albicans* ao anel.

Palavras chave: Aderência; Anel vaginal contraceptivo; *Candida albicans*; Candidíase vulvovaginal; Coagregação; *Lactobacillus acidophilus*.

^{a*} Divisão de Citologia Clínica, Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil

^b Divisão de Micologia Médica, Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil

^c Departamento de Biologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil

***Endereço para correspondência:** Prof^a Dr^a Márcia Edilaine Consolaro. Departamento de Análises Clínicas – DAC, Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas – LEPAC, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790, Bloco I89, sala 04. Maringá, Paraná, Brasil. CEP: 87020-900

Telefone: (44) 3261-4795

E-mail: melconsolaro@yahoo.com.br

Abstract

The purpose of this study was evaluate the function of the co-aggregation between *Candida albicans* and *Lactobacillus acidophilus* on the adhesion capacity of the yeast to NuvaRing[®] contraceptive vaginal ring (CCVR) in an attempt to understand what takes place in the vaginal environment. Two vaginal isolates of *C. albicans* and an ATCC strain of *L. acidophilus* were used. Pre-standardized concentrations of the isolated and co-aggregated microorganisms were employed on the CCVR adherence essays and on the determination of the cell surface hydrophobicity (CSH). The number of yeast and lactobacilli adhered to the ring was determined through colony-forming units per milliliter (CFU/mL). Scanning electron microscopy (SEM) of the liquid co-aggregate and of the adherence of the isolated and co-aggregated microorganisms to the ring was carried out. Both *C. albicans* and *L. acidophilus* have high adhesion capacity to the CCVR, without differences between the two isolates of the yeast ($p > 0.05$). From one hour or more of co-aggregation, there was an increase in the adhesion capacity of the yeast ($p < 0.001$), matched by a diminished adhesion of the lactobacilli ($p < 0.001$). SEM demonstrated the characteristics of the co-aggregation and the adhesion of the isolated and co-aggregated microorganisms to the CCVR. There was no relation between CSH of the co-aggregates and their adhesion capacity to the CCVR *in vitro*. Considering that there would be a correlation of these findings with the conditions *in vivo*, the use of probiotics based on *L. acidophilus* or its presence in the vaginal flora would not protect against the adhesion of *C. albicans* to the ring.

Keywords: Adherence; Contraceptive Vaginal Ring; *Candida albicans*; Vulvovaginal Candidiasis; Co-aggregation; *Lactobacillus acidophilus*.

INTRODUÇÃO

Novos métodos contraceptivos têm sido desenvolvidos para melhorar a sua segurança e tolerabilidade sem comprometer a eficácia [1], dentre eles encontra-se o

anel vaginal contraceptivo combinado (AVCC). O NuvaRing[®] (Organon USA Inc., Roseland, NJ) é um AVCC plástico composto por evatane, flexível e transparente, com diâmetro externo de 54 mm e espessura de 4 mm, que libera 15 µg de etinilestradiol (EE) e 120 µg de etonogestrel (ENG) por dia. Cada anel é destinado a um ciclo de uso compreendendo três semanas. É um contraceptivo com excelente controle de ciclo hormonal, pode ser inserido e removido com facilidade pela própria usuária e apresenta alto nível de segurança. Após a interrupção da sua utilização, há um rápido retorno aos ciclos normais. Em caso de esquecimento da remoção do anel, o mesmo continua a inibir a ovulação por mais uma semana, reforçando a sua excelente segurança [2].

Mesmo com todas as vantagens deste novo contraceptivo, deve-se considerar que o AVCC é um corpo estranho inserido em um ecossistema complexo, composto de diferentes espécies de bactérias e leveduras, que são isoladas da vagina de 20-25% das mulheres adultas saudáveis [3]. O equilíbrio deste ecossistema pode ser rompido pelo uso do AVCC, desencadeando uma predisposição para o desenvolvimento de candidíase vulvovaginal (CVV), inclusive recorrente (CVVR). Esta infecção é ocasionada pelo crescimento anormal de leveduras na mucosa do trato genital feminino, principalmente *Candida albicans*, seguida por *Candida glabrata* [3]. Camacho et al. [4] relataram em seus estudos a ocorrência de adesão *in vitro* de leveduras ao AVCC, o que poderia auxiliar na manutenção da levedura no ambiente vaginal, favorecendo a infecção.

O uso do AVCC pode influenciar também no desenvolvimento da CVV devido à liberação de estrogênio, que possui uma ação direta tanto nas células do epitélio vaginal quanto nas leveduras, favorecendo a infecção conforme os mecanismos a seguir: a) células de *Candida* apresentam receptores para estrogênio que, quando estimulados pelas altas concentrações hormonais, implicam no aumento da colonização vaginal e da proliferação fúngica [5]; b) o hormônio estimula a maturação das células do epitélio pluriestratificado escamoso vaginal, às quais *C. albicans* apresenta grande capacidade de adesão [6]; c) o epitélio maduro produz grandes quantidades de glicogênio, que é um substrato para *C. albicans*; d) esta grande quantidade de glicogênio mantém o pH vaginal muito ácido durante todo o período de uso do AVCC, que é propício ao desenvolvimento de leveduras [6].

Lactobacilos estão envolvidos na manutenção da microbiota vaginal normal por prevenir o crescimento excessivo de organismos patogênicos e oportunistas [7]. Eles podem atuar pela ativação do sistema imune, pela competição com outros

microrganismos na aderência ao epitélio vaginal, e também por produzir bacteriocinas, ácido láctico e peróxido de hidrogênio [8]. A ocorrência de coagregação entre *C. albicans* e *Lactobacillus acidophilus* é de grande importância na manutenção do microambiente vaginal principalmente por reduzir a adesão da levedura ao epitélio vaginal [9]. Em vista do exposto, os lactobacilos têm sido utilizados de forma empírica em formulações orais ou vaginais por muitas mulheres para prevenir CVV e principalmente CVVR. Contudo, esta efetividade não está cientificamente comprovada [10]. Além disso, pouco se sabe sobre a função da coagregação na adesão às superfícies inertes, como o AVCC.

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a função da coagregação entre *C. albicans* e *L. acidophilus* sobre a capacidade de adesão da levedura em AVCC NuvaRing® em uma tentativa de entender o que ocorre no ambiente vaginal.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismos

Foram utilizados dois isolados de *Candida albicans* (Ca1 e Ca2) e uma cepa de lactobacilos. As leveduras foram provenientes de exudato vaginal, identificadas por métodos clássicos [11] e moleculares [12]. As leveduras encontravam-se estocadas a -20°C no Laboratório de Micologia Médica da Universidade Estadual de Maringá – Paraná. *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356) foi cedido pela Fundação Instituto Oswaldo Cruz/Rio de Janeiro/Brasil.

Preparo das suspensões de microrganismos e ensaio de coagregação

As leveduras foram cultivadas em Sabouraud Dextrose Agar a 25°C por 24 h e os lactobacilos em SL Rogosa Agar a 37°C por 72 h em microaerofilia. Foram utilizadas suspensões contendo 1×10^7 UFC/mL (unidades formadoras de colônias por mililitro de suspensão) de cada levedura (Ca1 e Ca2) [4] e de 1×10^8 UFC/mL de *L. acidophilus* [9]. Estas foram preparadas em solução salina estéril (0,9% NaCl) para os ensaios de adesão destes microrganismos isolados ao AVCC e em tampão de coagregação (tampão CoAg- 20 mM Tris-HCL pH 7,8, 0,1 mM CaCl, 0,1 mM MgCL, 0,015 M Na Cl, 0,02% NaN₃) para a ocorrência deste processo. Iguais volumes (500 µL) das suspensões de levedura (Ca1 ou Ca2) e lactobacilos foram colocados em contato e co-incubados a 37°C sob agitação a 100 rpm por 4 h. A coagregação foi

avaliada à microscopia óptica comum, 1 h e 4 h após a incubação e considerada positiva quando era observada a presença de agregados formados pela interação levedura-lactobacilo [9].

Quantificação das leveduras e lactobacilos aderidos por UFC/mL

Para os ensaios de aderência, anéis vaginais NuvaRing® foram seccionados assepticamente, em fragmentos de 1,0 cm, os quais foram chamados de corpos de prova de NuvaRing® (CPNR). CPNR foram colocados em contato com 500 µL da suspensão das leveduras Ca1 e Ca2, dos lactobacilos e dos coagregados (de 1 e 4 h), respectivamente, e incubados por 1 h a 37°C sob agitação constante a 100 rpm. A seguir, os CPNR foram lavados com agitação em vórtex (AP56, Phoenix, Brasil) para remoção dos microrganismos não aderidos e posteriormente agitados mais vigorosamente com pérolas de vidro para remoção dos microrganismos fortemente aderidos. A quantificação dos microrganismos aderidos aos CPNR foi determinada por UFC/mL. Os ensaios foram realizados em triplicata, em três dias distintos [4].

Determinação da hidrofobicidade da superfície celular (HSC) dos microrganismos

Após crescimento dos microrganismos isolados bem como da obtenção do coagregado de 4 horas, como descrito acima, Ca1, Ca2, lactobacilos e coagregados de 4 horas (Ca1/lactobacilos e Ca2/lactobacilos) foram lavados com solução tampão PUM (128 mM K₂HPO₄, 54 mM KH₂PO₄, 30 mM uréia, 1 mM MgSO₄; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) e ressuspensos no mesmo tampão a uma concentração final de 1x10⁶ células/mL. Alíquotas de 3,0 mL da suspensão foram misturadas com 400 µL de n-hexadecano (Sigma Chemical Co.), incubadas em banho-Maria por 10 min a 37°C e agitadas. Após a separação das duas fases, a absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 520 nm. Os resultados foram expressos como a percentagem de células que aderiram ao n-hexadecano, comparativamente ao controle, no qual o n-hexadecano não foi adicionado [13].

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os CPNR foram incubados a 37°C por 48 h em contato com cada um dos seguintes microrganismos: Ca1, Ca2, lactobacilos e coagregados de 4 h sob agitação constante a 100 rpm. Alíquotas dos coagregados em meio líquido bem como os CNPR foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M (Sigma Chemical

Co., USA) e desidratados em série crescente de solução alcoólica. O ponto crítico foi obtido em Balzers CPD-010 (Balzers instruments, Balzers, Liechtenstein) com gás carbônico. A metalização em ouro foi feita em Balzers SCD-030 (Balzers Instruments, Balzers, Liechtenstein). A documentação foi realizada utilizando microscópio eletrônico de varredura JEOL-JSM 6360 LV (Jeol Ltda, 33 Tokyo, Japan) no Centro de Microscopia Eletrônica – Universidade Federal do Paraná, PR.

Análise estatística

Os resultados foram analisados usando test t e análise de variância para comparação da adesão entre as diferentes situações experimentais. O nível de significância foi fixado em 5%. Os testes foram realizados no software Graph Pad Prism® versão 3.0 (Graph Pad Software Inc.).

RESULTADOS

Coagregação

A coagregação de Ca1 e Ca2 com lactobacilos ocorreu já a partir de 1 h de experimento e para ambas as leveduras na forma de grandes agregados claramente visíveis à microscopia comum. Essa interação foi comprovada pela análise ultraestrutural por MEV (Figura 1). Foram observados grandes agregados (A-C) e íntima interação entre os microrganismos (C). Ca1 e Ca2 coagregaram na forma de blastoconídios (A-C) e também em brotamento (C), o que sugere a viabilidade celular.

3.2. Aderência

Todos os ensaios de aderência foram reprodutíveis ($p < 0,05$). Os três microrganismos, *L. acidophilus*, Ca1 e Ca2 isoladamente, mostraram elevada capacidade de aderir ao anel vaginal. *L. acidophilus* aderiu significativamente mais isoladamente que após coagregação tanto de 1 h quanto 4 h, sem diferença significativa entre os tempos de incubação. Em contrapartida, as leveduras tiveram sua capacidade de aderência aumentada após contato de 1 h com *L. acidophilus* ($p < 0,001$), característica mantida após 4 h (Tabela 1).

A MEV comprovou a aderência de *C. albicans*, *L. acidophilus* e coagregados destes microrganismos sobre os CPNR (Figuras 2 e 3). Não houve diferença nas

características de adesão entre Ca1 e Ca2 nem entre os coagregados destas leveduras. A Figura 2A mostra *C. albicans* 1 aderida na forma de blastoconídios isolados e 2B *L. acidophilus* perfeitamente aderidos, em pequenos agrupamentos. Na Figura 3 podem ser observados vários aspectos da adesão dos coagregados aos CPNR. Em A e B são observados coagregados alojados nas irregularidades da superfície do anel. Em C, maior detalhe da íntima associação dos microrganismos e sua adesão ao anel.

3.3. Hidrofobicidade

No ensaio dos microrganismos isolados, Ca1 e Ca2 não apresentaram diferença quanto à hidrofobicidade ($p>0,05$), já *L. acidophilus* foi mais hidrofóbico que os isolados de levedura ($p<0,05$). O coagregado de Ca2/lactobacilos foi mais hidrofóbico que o de Ca1/lactobacilos e também que Ca1 e Ca2 isolados ($p<0,05$), mas não que o lactobacilo isolado ($p>0,05$) (Figura 4).

DISCUSSÃO

Um dos grandes desafios das pesquisas sobre fisiopatogenia de doenças é aproximar o máximo possível às condições experimentais *in vitro* do que ocorre *in vivo*, que normalmente são muito mais complexas. As interações *in vitro* entre lactobacilos e outros microrganismos são mais simples do que as que ocorrem na complexidade da microbiota das mucosas humanas [10]. Mas pesquisadores reconhecem que apesar disto estes experimentos fornecem uma aproximação das condições *in vivo* [10,14]. Assim, neste estudo foi avaliada a função da coagregação entre *C. albicans* e *L. acidophilus*, sobre a capacidade de adesão da levedura em AVCC NuvaRing® em uma tentativa de entender o que ocorre no ambiente vaginal.

L. acidophilus foi utilizado por ser um dos lactobacilos mais comumente isolados da vagina [10,15], por coagregar com *C. albicans* [9] e por ser empregado como probiótico em alimentos convencionais (leite e iogurte) e suplementos alimentares [14]. Estudos *in vivo* apontam que o uso deste lactobacilo auxilia no controle de infecções urogenitais [14] e na proteção contra infecção anal e oral por *C. albicans* em ratas [16].

Estudos *in vivo* com pacientes saudáveis já mostraram que lactobacilos também coagregam com outros componentes da microbiota vaginal e uropatógenos potenciais [17]. Foi proposto que este processo seria uma das formas dos lactobacilos neutralizarem microrganismos uropatógenos, mantendo o balanço ecológico e inibindo

o desenvolvimento de infecções [13]. A coagregação pode impedir o acesso de patógenos à receptores presentes nas células do hospedeiro e inibir a sua adesão, que é fundamental para a colonização e desenvolvimento de microrganismos como *C. albicans* [9].

O ensaio de adesão evidenciou que tanto *C. albicans* quanto *L. acidophilus* possuem elevada capacidade de adesão ao AVCC. A partir de 1 h de contato, houve um aumento significativo na capacidade de adesão das leveduras acompanhado de uma significativa diminuição na adesão dos lactobacilos. Considerando que haja correlação desses achados com as condições *in vivo*, a utilização de probióticos à base de *L. acidophilus* ou a presença de uma microbiota vaginal normal constituída predominantemente por este lactobacilo não inibiria a adesão de *C. albicans* ao anel, ao contrário, poderia favorecer sua ocorrência.

Entretanto, deve ser considerado que o processo de adesão é multi-fatorial e que ocorre como resultado de sistemas de reconhecimento entre *Candida*-hospedeiro e consequentemente *Candida*-superfície de adesão, os quais são extremamente complexos e envolvem uma grande variedade de receptores e ligantes [18]. Já foi mostrado que a coagregação entre *C. albicans* e *L. acidophilus* diminui a adesão da levedura às células vaginais [9], diferente dos resultados para o anel mostrados nesse estudo. Isto pode ser decorrente da diferença entre os mecanismos de adesão a superfícies celulares e inertes, como o AVCC. A íntima associação entre levedura/lactobacilo no coagregado poderia expor receptores/ligantes de *C. albicans* que acarretam um incremento na adesão ao anel.

A HSC é um dos fatores envolvidos na aderência [19], uma vez que proteínas hidrofóbicas são encontradas embebidas na parede celular das leveduras e na membrana plasmática dos lactobacilos, promovendo a interação necessária para a ligação dos microrganismos a diferentes superfícies [4,19]. Os resultados de HSC do presente estudo mostraram-se diferentes para os coagregados (28,0% para Ca1/lactobacilo e 46,0% para Ca2/lactobacilo), sendo o primeiro semelhante à HSC de Ca1 e Ca2 isolados e o segundo à do lactobacilo isolado. Assim, não foi possível estabelecer relação entre hidrofobicidade dos coagregados e capacidade de adesão *in vitro* ao AVCC, diferentemente do descrito por Camacho et al. [4], que relacionaram a HSC de diferentes espécies de leveduras vaginais com capacidade de adesão *in vitro* ao AVCC. Estes dados reforçam a necessidade de aproximar os experimentos *in vitro* das condições *in vivo*, para que assim cada vez mais aspectos da fisiopatogenia da CVV

sejam elucidados. Porém, deve-se reforçar que as condições *in vivo* são dependentes da interação de múltiplos fatores relacionados aos microrganismos no complexo ecossistema vaginal, bem como das condições do hospedeiro, e neste ambiente não pode ser descartada alguma função da HSC dos microrganismos envolvidos.

Como consequência da capacidade de aderir, os microrganismos podem produzir biofilmes, que são agregados de microrganismos unicelulares formando estruturas multicelulares aderentes a superfícies [4]. Microrganismos envolvidos em biofilmes são geralmente mais resistentes aos antimicrobianos e aos mecanismos de defesa do hospedeiro do que microrganismos planctônicos. Com isto, os biofilmes tornam-se uma progressiva fonte de infecção, principalmente quando ocorrem em dispositivos médicos implantados [19]. Neste trabalho foram visualizados leveduras e lactobacilos coagregados em íntima associação, alojados nas irregularidades da superfície do anel, evidenciando a possibilidade de formação de biofilme na superfície do AVCC. Corroborando com estes dados, Karawarai et al. [19] descrevem que bactérias produtoras de ácido lático, como o *L. acidophilus*, apresentam a capacidade de produzirem biofilmes com diferentes espécies de leveduras.

O AVCC tem mostrado a mesma eficácia contraceptiva que os contraceptivos hormonais combinados (COCs), com as vantagens de baixos níveis hormonais sistêmicos e melhor controle do ciclo [1,2,20]. Outras vantagens incluem aceitabilidade pelas mulheres, método contraceptivo mensal de fácil auto-inserção e remoção, conforto e segurança [1,2]. Entretanto, AVCC tem sido implicado em aumentar o risco de eventos locais tais como vaginite e leucorréia relacionados ao dispositivo, motivos que tem resultado em maiores taxas de descontinuidade do que dos COCs [20]. Sintomas de vaginites aparecem em 13,7% das mulheres usuárias [2]. Segundo Oddsson et al. [20], a maioria dos casos de vaginite decorrentes do uso do anel é ocasionada por *Candida*. Por isto, são muito importantes os estudos que visem alternativas de controle deste problema. No presente estudo, foi mostrado que a co-existência e consequente coagregação entre *C. albicans*, principal agente de CVV, e *L. acidophilus*, leva a um aumento significativo na adesão *in vitro* de *C. albicans* e uma diminuição dos lactobacilos ao AVCC. Esses resultados sugerem que o uso de probióticos à base de *L. acidophilus* e mesmo uma microbiota lactobacilar vaginal não surtiriam efeito protetor contra a adesão de *C. albicans* ao AVCC. A HSC dos coagregados parece não influenciar isoladamente na sua adesão ao AVCC.

REFERÊNCIAS

- [1] Zurawin RK, Ayensu-Coker L. Innovations in contraception: a review. *Clin Obstet Gynecol* 2007;50:425-39.
- [2] Roumen FJME, Apter D, Mulders TMT, Dieben TOM. Efficacy, tolerability and acceptability of a novel contraceptive vaginal ring releasing etonogestrel and ethinyl oestradiol. *Hum Reprod* 2001;16:469-75.
- [3] Sobel J, Chaim W. Vaginal microbiology of women with acute recurrent vulvovaginal candidiasis. *J Clin Microbiol* 1996;34:2497-9.
- [4] Camacho DP, Consolaro MEL, Patussi, EV, Donatti L, Gasparetto A, Svidzinski TIE. Vaginal yeast adherence to the combined contraceptive vaginal ring (CCVR). *Contraception* 2007;76:439-443.
- [5] Ringdahl EN. Treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Am Fam Physician* 2000;61:3306-12.
- [6] Irie MMT, Consolaro MEL, Guedes TA, Donatti L, Patussi EV, Svidzinski TI. A simplified technique for evaluating the adherence of yeasts to human vaginal epithelial cells. *J Clin Lab Anal* 2006;20:195-203.
- [7] Ronnqvist PD, Forsgren-Brusk UB, Grahn-Hakansson EE. Lactobacilli in the female genital tract in relation to other genital microbes and vaginal pH. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2006;85:726-35.
- [8] Aroutcheva A, Gariti D, Simon N, et al. Defense factors of vaginal lactobacilli. *Am J Obstet Gynecol* 2001;185:375-9.
- [9] Boris S, Suarez J, Vazquez F, Barbes C. Adherence of human vaginal Lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. *Infect Immun* 1998;66:1985-9.
- [10] Falagas ME, Betsi GI, Athanasiou S. Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review. *J Antimicrobial Chemotherapy* 2006;58:266-72.
- [11] Kurtzman CP, Fell FW. *The yeast. A taxonomic study*. Amsterdam: Elsevier, Inc; 1998. p. 891-913.
- [12] Sugita T, Kurosaka S, Yajitate M, Sato H, Nishikawa A. Extracellular proteinase and phospholipase activity of tree genotypic strains of a human pathogenic yeast, *Candida albicans*. *Microbiol Immunol* 2002;46:881-3.

- [13] Sweet SP, MacFarlane TW, Samaranayake LP. Determination of cell surface hydrophobicity of oral bacteria using a modified hydrocarbon adherence method. *FEMS Microbiol Lett* 1987;48:159-68.
- [14] Sanders ME, Klaenhammer TR. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. *J Dairy Sci* 2001;84:319-31.
- [15] Strus M, Kucharska A, Kukla G, Brzywczy-Wloch M, Maresz K, Heczko PB. The *in vitro* activity of vaginal *Lactobacillus* with probiotic properties against *Candida*. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* 2005;13:69-75.
- [16] Wagner RD, Pierson C, Warner T, et al. Biotherapeutic effects of probiotic bacteria on candidiasis on immunodeficient mice. *Infect Immun* 1997a;65:4165-72.
- [17] Reid G, McGroarty AJ, Domingue PAG, et al. Coaggregation of urogenital bacteria *in vitro* and *in vivo*. *Curr Microbiol* 1990;20:47-52.
- [18] Grimaudo NJ, Nesbitt WE. Coaggregation of *Candida albicans* with oral *Fusobacterium species*. *Oral Microbiol Immunol* 1997;12:168-173.
- [19] Jabra-Rizki MA, Falker WA, Merz WG, Baqui AAMA, Kelley JI, Meiller TF. Cell surface hydrophobicity-associated adherence of *Candida dubliniensis* to human buccal epithelial cells. *Rev Iberoam Micol* 2001;18:17-22.
- [20] Oddsson K, Leifels-Fischer B, Melo NR, et al. Efficacy and safety of a contraceptive vaginal ring (NuvaRing) compared with a combined oral contraceptive: a 1-year randomized trial. *Contraception* 2005;71:176-82.

Tabela 1. Número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) de *C. albicans* 1 e 2 e *L. acidophilus* obtidas em ensaios de aderência *in vitro* sobre anel vaginal contraceptivo NuvaRing[®], após 1 hora de incubação individualmente, e após 1 e 4 h de coagregação.

	UFC/mL (média±DP) ^a		
	<i>Isolado</i>	<i>Coagregado 1 h</i>	<i>Coagregado 4 h</i>
<i>C. albicans</i> 1 ^b	1080 ± 60,40*	3131 ± 391,3*■	2811±216,9*■
<i>C. albicans</i> 2 ^b	1761 ± 116,9*	2701 ± 141,0*■	2974 ± 198,1*■
<i>L. acidophilus</i> ^b	2469 ± 268,1 [□]	1327 ± 164,4 [◇]	1170±39,93 [◇]

^a Média dos experimentos em triplicata, em três dias distintos±DP

^b Microrganismos aderidos/mL do anel.

* *C. albicans* 1 e 2 em ensaios isolados aderiram significativamente menos no anel vaginal do que após coagregação de 1h e 4h com *L. acidophilus* ($p < 0,001$).

■ Não houve diferença significativa na adesão de *C. albicans* 1 e 2 com 1h e 4h de coagregação ($p > 0,05$).

□ *L. acidophilus* aderiram significativa mais ao anel isoladamente que após coagregação de 1h e 4h ($p < 0,001$).

◇ Não houve diferença significativa na adesão ao anel do *L. acidophilus* com a coagregação de 1h e 4h ($p > 0,05$).

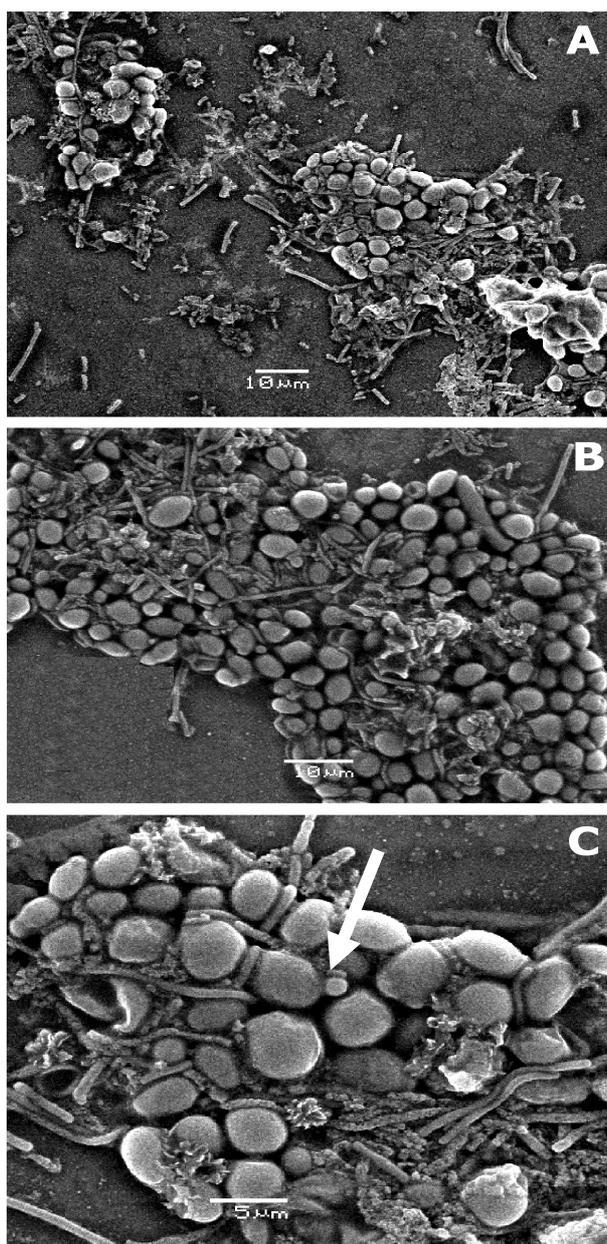


Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura da suspensão de coagregado em meio líquido entre *C. albicans* e *L. acidophilus* após incubação por 48 h/37°C sob agitação a 100 rpm. De A-C podem ser vistos grandes coagregados e em C detalhes da íntima interação entre os microrganismos. *C. albicans* coagregou na forma de blastoconídios (A-C) e de brotamento (C-seta), comprovando sua viabilidade.

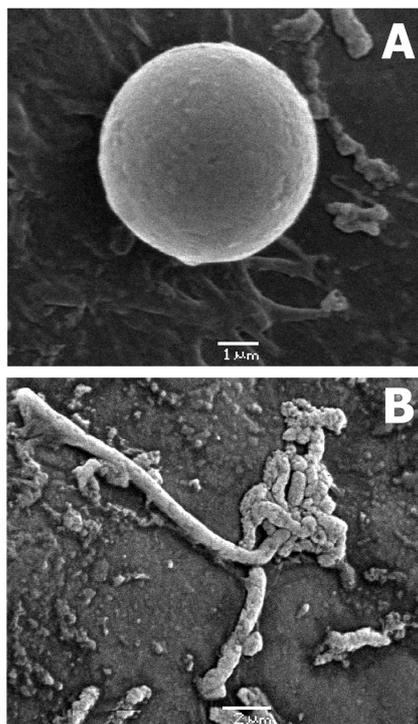


Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura de *C. albicans* e *L. acidophilus* aderidos individualmente ao NuvaRing® após incubação por 48 h/37°C sob agitação a 100 rpm. Em A, *C. albicans* aderida na forma de blastoconídio isolado e em B *L. acidophilus* perfeitamente aderidos, em pequenos agrupamentos.

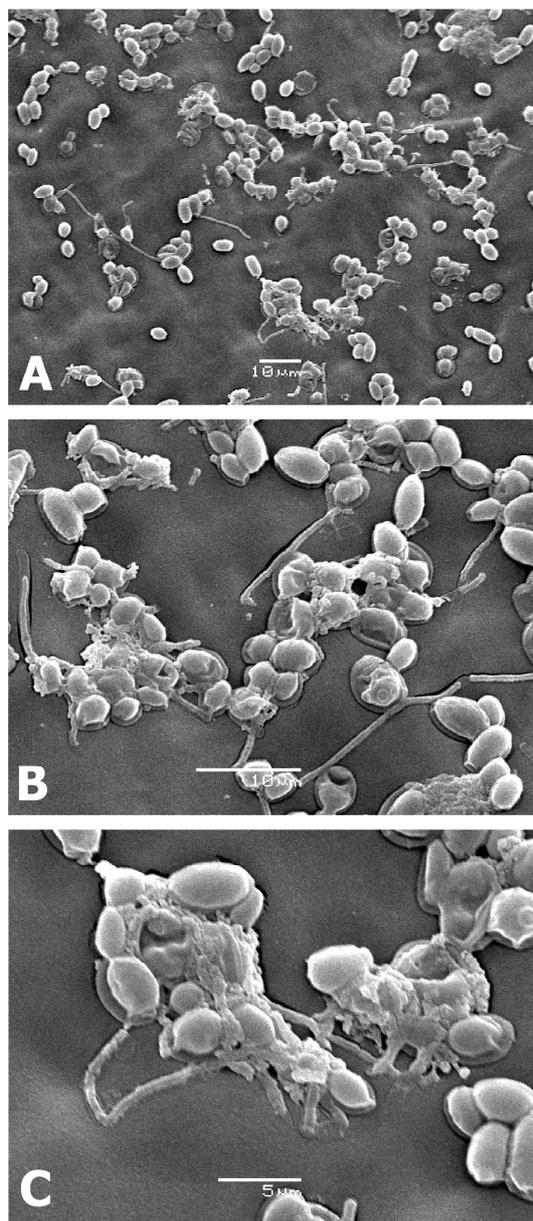


Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura do coagregado de 4 h de *C. albicans* e *L. acidophilus* após incubação com NuvaRing® por 48 h/37°C sob agitação a 100 rpm. Em A e B, são observados coagregados perfeitamente alojados nas irregularidades da superfície do anel. Em C, maior detalhe da íntima associação dos microrganismos e sua adesão ao anel.

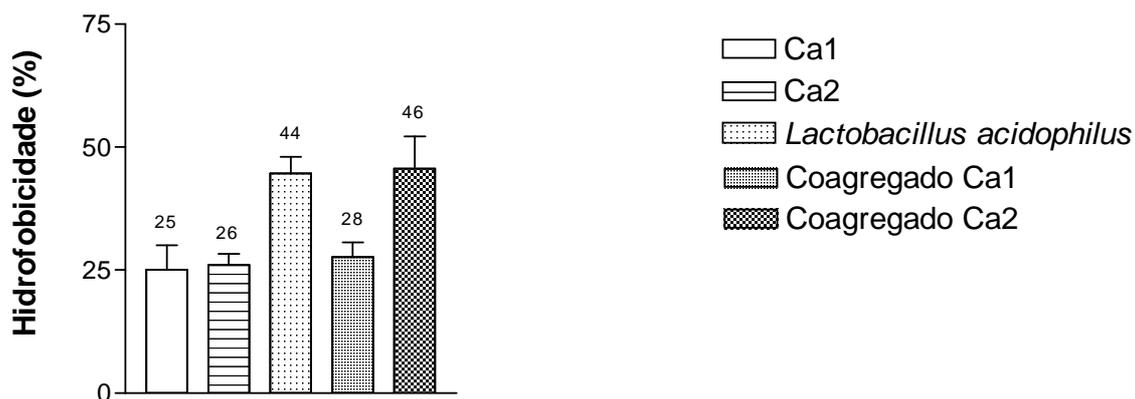


Figura 4. Percentagem de hidrofobicidade de superfície celular (HSC) dos microrganismos testados nos ensaios de aderência. No ensaio dos microrganismos isolados, Ca1 e Ca2 não apresentaram diferença quanto à hidrofobicidade ($p > 0,05$), enquanto *L. acidophilus* foi mais hidrofóbico que os isolados de levedura ($p < 0,05$). O coagregado de Ca2/lactobacilos foi mais hidrofóbico que o de Ca1/lactobacilos e também que Ca1 e Ca2 isolados ($p < 0,05$), mas não que o lactobacilo isolado ($p > 0,05$).

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

No presente estudo, nós procuramos mimetizar o ambiente vaginal, avaliando a função da coagregação entre *C. albicans* e *L. acidophilus* sobre a capacidade de adesão da levedura em AVCC NuvaRing[®]. Nossos resultados mostraram que a co-existência e conseqüente coagregação entre *C. albicans*, principal agente de CVV, e *L. acidophilus*, leva a um aumento significativo na adesão *in vitro* de *C. albicans* e uma diminuição dos lactobacilos ao AVCC. Esses resultados sugerem que probióticos à base de *L. acidophilus* e mesmo uma flora lactobacilar vaginal não surtiriam efeito protetor. A HSC dos coagregados não foi relacionada com a sua adesão ao AVCC.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- Realizar novos estudos in vitro com outras leveduras causais de CVV bem como com outras cepas de lactobacilos frequentemente isolados da vagina;
- Realizar estudos com pacientes usuárias de AVCC, com intuito de avaliar sua microbiota vaginal através de cultura antes do início de uso e mensalmente após a retirada do mesmo;
- Realizar cultura para leveduras e outros microrganismos dos AVCC utilizados por estas pacientes;
- Realizar MEV destes anéis para determinar o tipo de adesão e de microrganismos aderidos aos AVCC.