

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

MÁRCIA APARECIDA CARRARA

Efeito do diabetes experimental no desenvolvimento e manutenção da candidíase
vulvovaginal em ratas

Maringá
2009

MÁRCIA APARECIDA CARRARA

Efeito do diabetes experimental no desenvolvimento e manutenção da candidíase vulvovaginal em ratas

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 Regina Batista

Maringá
2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

MÁRCIA APARECIDA CARRARA

Efeito do diabetes experimental no desenvolvimento e manutenção da candidíase vulvovaginal em ratas

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.

COMISSÃO JULGADORA

Prof^a Dr^a Márcia Regina Batista
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof^a Dr^a Vilma Aparecida Ferreira de Godoi Gazola
Universidade Estadual de Maringá

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

Prof^a Dr^a Helenir Medri de Souza
Universidade Estadual de Londrina

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

Aprovada em: 03 de janeiro de 2010.

DEDICATÓRIAS

Dedico este trabalho,
À minha família, por todo amor,
dedicação e incentivo constante.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder suas bênçãos, proteção e capacidade para sempre aprender.

Ao meu pai, por ter me concedido a educação necessária para chegar até aqui e sempre ir em frente.

A minha mãe, por estar sempre ao meu lado me apoiando e ajudando nas horas mais difíceis.

As minhas irmãs por serem pessoas tão especiais e importantes na minha vida.

Ao meu namorado Rodrigo, pela paciência, carinho, amor e compreensão.

A meus grandes amigos Moisés e Rodrigo, que sempre me apóiam e incentivam na jornada.

A minha orientadora, Márcia, por toda atenção, carinho, auxílio constante, e principalmente pela amizade.

Ao Carlos Eduardo (Carlão), pelo constante apoio técnico.

Aos companheiros de mestrado, pela parceria na jornada.

Ao Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia por proporcionar as condições necessárias para realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein

Efeito do diabetes experimental no desenvolvimento e manutenção da candidíase vulvovaginal em ratas

RESUMO

O objetivo deste estudo foi verificar a influência do diabetes experimental sobre a candidíase vulvovaginal (CVV) em ratas. Os animais foram divididos em grupo controle (grupo C) e grupo diabético experimental (grupo D) e pesados no começo e no final dos experimentos. O diabetes foi induzido através da administração de injeção endovenosa de aloxana (41 mg/kg). Após uma semana, confirmou-se a instalação do diabetes através da avaliação glicêmica. A infecção vaginal foi induzida por *Candida albicans* e após uma semana a infecção foi detectada através de cultura vaginal e esfregaços corados por Papanicolaou. O controle da infecção foi feito por um período de 5 semanas. Os resultados apontaram diferenças estatísticas entre as glicemias do grupo C ($74,8 \pm 2,6$ mg/dL) e do grupo D ($543,1 \pm 12,1$ mg/dL) ($P = 0,0001$) e redução significativa ($P = 0,0072$) do peso corporal ($227,6 \pm 4,77$ g e $204 \pm 6,39$ g para os grupos C e D, respectivamente). Além disso, a cultura, os esfregaços de Papanicolaou e a microscopia eletrônica de varredura (MEV) demonstraram permanência da infecção durante o período avaliado apenas no grupo D. Dessa forma, concluímos que o diabetes experimental foi favorável ao desenvolvimento e manutenção da CVV por *Candida albicans*.

Palavras-chave: *Candida albicans*, diabetes experimental, ratas, candidíase vulvovaginal

Effect of experimental diabetes on the development and maintenance of vulvovaginal candidiasis in female rats

ABSTRACT

The aim of this study was to verify the influence of the experimental diabetes on vulvovaginal candidiasis (VVC) in female rats. The animals were divided into control group (C group) and experimental diabetic group (D group) and were weighed in the beginning and at the end of experiments. Diabetes was induced by an endovenous injection of alloxan (41 mg/kg). After a week, the diabetes confirmation was done by glycemic evaluation. The infection vaginal was induced by *Candida albicans* yeasts and after a week the infection was detected by vaginal culture and smears stained by Papanicolaou. The infection control was made for a period of 5 weeks. The results pointed to different glycemias between the C (74.8 ± 2.6 mg/dL) and D groups (543.1 ± 12.1 mg/dL) ($P = 0.0001$) and a significant body weight ($P = 0.0072$) decrease (227.6 ± 4.77 g and 204 ± 6.39 g to C and D group, respectively). Moreover, the culture, Papanicolaou smears and scanning electron microscopy (SCEM) demonstrated persistence of infection during the study period only in group D. The diabetes mellitus was favorable to the development and maintenance of VVC by *Candida albicans*.

Key words: *Candida albicans*, experimental diabetes, female rats, vulvovaginal candidiasis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Glycemia difference between the C and D groups after the diabetes induction.....	35
Figura 2 Reduction in the D group body weight in comparison to the C group.....	36
Figura 3 Papanicolaou cytology of the diabetic rat.....	37
Figura 4 Electron microscopy of the vaginal epithelium of the diabetic rat.....	38

Dissertação elaborada conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas a Farmácia e artigo científico elaborado e formatado conforme as normas das publicações científicas: *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, disponível em: <http://www.sciencedirect.com>

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	12
O Gênero <i>Candida</i>	12
Candidíase vulvovaginal.....	13
Diabetes mellitus.....	15
Diabetes experimental.....	17
Justificativas.....	19
Objetivos.....	19
Referências bibliográficas.....	20
CAPÍTULO II.....	24
Effect of experimental diabetes on the development and maintenance of vulvovaginal candidiasis in female rats.....	25
CAPÍTULO III.....	39
Conclusões.....	39
Perspectivas futuras.....	40

CAPÍTULO I

O GÊNERO *Candida*

As leveduras do gênero *Candida* estão amplamente distribuídas na natureza, podendo algumas espécies viver em vida saprofítica ou parasitária no organismo do homem e de outros animais (LACAZ, 1980). Este é um gênero de fungos patogênicos constituído por aproximadamente 200 diferentes espécies, que segundo Álvares (2007) podem viver nos mais diversos nichos corporais, como orofaringe, cavidade bucal, dobras da pele, secreções brônquicas, vagina, urina e fezes.

As leveduras de *Candida* comportam-se como agentes oportunistas, estando sua virulência condicionada a fatores ligados ao hospedeiro, o qual, em condições fisiológicas ou na vigência de entidades mórbidas diversas, desenvolve quadros clínicos variados, com lesões superficiais ou profundas (LACAZ, 1980). São responsáveis por colonização, infecções fúngicas superficiais em imunocompetentes e infecções sistêmicas em imunossuprimidos (CROCCO et al., 2004).

As leveduras de *Candida* colonizam as mucosas de todos os seres humanos no decorrer, ou pouco depois do nascimento, havendo sempre o risco de infecção endógena (BROOKS et al., 2000). O delicado balanço entre o hospedeiro e este fungo comensal pode transformar-se em uma relação parasitária, resultando no desenvolvimento de infecções denominadas candidíases (CHAFFIN et al., 1998).

Dentre as candidíases existentes, a candidíase vulvovaginal (CVV) é de grande importância clínica, por acometer mulheres em idade reprodutiva, causando grande desconforto e interferindo nas relações sexuais e afetivas. Essa infecção é caracterizada por inflamação da vagina devido à infecção por leveduras, principalmente do gênero *Candida* (ROSA & RUMEL, 2004).

De todas as espécies de *Candida* potencialmente patógenas para o homem e animais, destaca-se a *Candida albicans* (LACAZ, 1980). Essa espécie é de grande relevância em função de sua taxa de prevalência em condições de normalidade e de doença (RIPPON, 1974; KURZTMAN; FEEL, 1998). Trata-se de uma espécie que está amplamente distribuída na natureza, ocupando diversos habitats, ao contrário de outras espécies do gênero, de distribuição

limitada (ÁLVARES, 2007). Além disso, está muito bem adaptada ao corpo humano, sendo capaz de colonizá-lo sem produzir sinais de doença em condições de normalidade fisiológica (ESTEVEES, 1990; GHANNOUM; RADWAN, 1990).

Essa espécie caracteriza-se por ser um fungo dimórfico que apresenta formas leveduriformes (blastocónídeos) no estado saprofítico, associado à colonização assintomática ou como formas filamentosas (pseudo-hifas e hifas verdadeiras) observadas em processos patogênicos. Além disto, sob condições de crescimento sub-ótimas, neste fungo pode ocorrer a formação de clamidiósporos, que são esporos arredondados que possuem uma espessa parede celular. Graças a essa plasticidade *C. albicans* tem a capacidade de se adaptar a diferentes nichos biológicos, podendo ser considerado, a rigor, um organismo polimórfico (LACAZ, 1980).

CANDIDÍASE VULVOVAGINAL (CVV)

A CVV, patologia ocasionada pelo crescimento anormal de fungos do tipo leveduras no trato genital feminino, é uma infecção vulvovaginal causada por leveduras comensais que habitam a mucosa vaginal bem como a mucosa digestiva e respiratória, principalmente *C. albicans*. De 80 a 90% dos casos são devidos à *C. albicans*, e de 10 a 20% a outras espécies chamadas não-*albicans* (*C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. lusitania*). *C. glabrata* é a segunda espécie em frequência nas CVV (SOBEL, 1993; PICHOVÁ et al., 2001; CHONG et al., 2003).

Estima-se que 75% das mulheres terão um episódio de CVV ao longo de suas vidas, sendo que 40 a 50% destas terão novos episódios e cerca de 5% desenvolverão o padrão crônico, com episódios de repetição (candidíase vulvovaginal recorrente) (SOBEL, 1993). Seu diagnóstico é, portanto, um dos mais frequentes na prática diária em ginecologia e sua incidência têm aumentado significativamente, tornando-se a segunda infecção genital mais frequente nos Estados Unidos e no Brasil, representando 20 a 25% dos corrimentos vaginais de natureza infecciosa, precedida apenas pela vaginose bacteriana (CORSELLO et al., 2003). Na Europa, é a primeira causa de vulvovaginite (ZIARRUSTA, 2002).

Por acometer milhões de mulheres anualmente, determinando grande desconforto, interferindo nas relações sexuais e afetivas e prejudicando o desempenho laboral, além de ser, às

vezes, de difícil tratamento, a CVV tem sido considerada um importante problema de saúde pública mundial. Não obstante a magnitude do problema, muito existe ainda para ser conhecido sobre a fisiopatogenia da infecção (HOLANDA et al., 2007).

Segundo Ziarrusta (2002), as leveduras de *Candida* podem tornar-se patogênicas quando o local de colonização do hospedeiro se torna favorável para o seu desenvolvimento. Nessas situações, a CVV caracteriza-se por prurido, ardor, dispareunia e pelo surgimento de um corrimento vaginal em grumos, semelhante à nata do leite. Com frequência, a vulva e a vagina encontram-se edemaciadas e hiperemiadas, algumas vezes acompanhadas de ardor ao urinar e sensação de queimadura (ESTEVEES, 1990; SOBEL, 1990). As lesões podem estender-se pelo períneo, região perianal e inguinal (ALMEIDA et al., 1995). O corrimento geralmente é branco e espesso, 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 da vagina aumenta (SALVATORE, 1980).

A principal fonte dessas 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. A transmissão sexual também é aceita, o que a torna uma doença sexualmente transmissível (DST) (ESTEVEES, 1990). Através da 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 reservatórios para reinfecções posteriores (FIDEL; SOBEL, 1996).

Já é conhecido que a patogênese desta infecção envolve a aderência inicial das leveduras à mucosa vaginal seguida pela colonização assintomática, podendo ocorrer à passagem das leveduras deste estado para agente infeccioso (vaginite sintomática). São reconhecidos como fatores predisponentes: colonização prévia por levedura, diminuição da capacidade de resposta imunológica observada em doenças imunossupressoras, Diabetes mellitus, gestantes, usuárias crônicas de corticóides. Ainda parecem contribuir o uso de antibióticos, estrogênio-terapia, pequenos traumas como o ato sexual, hábito de usar roupas muito justas ou de fibras sintéticas, além da dieta alimentar (BIBBO et al., 1976; ROSA; RUMEL, 2004).

Observações clínicas mostram que CVV ocorre sempre durante a fase lútea do ciclo menstrual, quando os níveis de estrógeno e progesterona estão elevados (KALO-KLEIN, 1991).

Em contraste, mulheres na pré-menarca e na pós-menopausa que não recebem reposição hormonal, raramente apresentam esta infecção (RYLEY,1986). Entretanto, os fatores responsáveis pela transformação do estado assintomático para infeccioso e os mecanismos que resultam nos seus efeitos patogênicos são pobremente compreendidos (CONSOLARO et al., 2005).

O comportamento dos epitélios e estroma cervical e vaginal de roedores em face a esteróides sexuais é semelhante ao humano (KAUSHIC et al., 2000). Em decorrência disto, modelos animais de candidíase vaginal experimental têm sido extremamente úteis na identificação de fatores relativos à susceptibilidade a infecção como, por exemplo, o elevado nível de estrógeno sanguíneo (SCHIMID et al., 1990; NOHMI et al., 1995; SOBEL et al., 1998; CALDERON et al., 2003).

DIABETES MELLITUS

O Diabetes mellitus (DM) é uma síndrome de comprometimento do metabolismo dos carboidratos, das gorduras e das proteínas, causada pela ausência de secreção de insulina ou por redução da sensibilidade dos tecidos à insulina (GUYTON & HALL, 2002). Caracteriza-se por poliúria, polidipsia, polifagia, emagrecimento rápido, astenia, diminuição brusca da acuidade visual e hiperglicemia (NÓBREGA et al., 2005).

Devido à alta prevalência e aos efeitos potenciais deletérios sobre o estado físico e psíquico do paciente, que pode resultar em uma condição mórbida, o DM é uma grande preocupação médica (CARVALHO, 2003). É um importante problema de saúde pública mundial visto que estima-se que existam mais de 150 milhões de pessoas com diabetes no mundo, e projeções da Organização Mundial de Saúde para 2025 sugerem que esse número possa chegar a 300 milhões (LERCO et al., 2003).

Um dos problemas associados com a condição diabética é a infecção (MALAZY et al., 2007). O DM predispõe indivíduos a infecções bacterianas e fúngicas, incluindo aquelas causadas por espécies de *Candida*. Segundo Goswami (2006), pacientes com DM têm risco aumentado de desenvolver candidíase vulvovaginal (CVV). Muitos outros investigadores têm demonstrado que

a CVV ocorre mais freqüentemente em pacientes diabéticas (ZDOLSEK et al., 1995; BOHANNON et al., 1998).

A hiperglicemia é a principal causa do aumento da susceptibilidade de pacientes diabéticas a CVV (BOHANNON, 1998; MALAZY et al., 2007). Um aspecto que tem sido descrito é que células epiteliais de mucosa vaginal, urinária e bucal de diabéticos apresentam aumento da aderência para alguns patógenos como a *C. albicans* e *Escherichia coli*. (FOSS et al., 2005).

O aumento dos níveis de glicose nos tecidos genitais estimula a adesão e o crescimento das leveduras (BOHANNON, 1998). Segundo Leon et al. (2002) indivíduos hiperglicêmicos podem apresentar risco aumentado para colonização por *Candida*, uma vez que suas secreções contêm maiores concentrações de glicose, que pode servir como nutriente para o fungo. As células do epitélio vaginal estão mais propensas a se ligarem a *C. albicans* em pacientes diabéticas do que em pacientes não-diabéticas, mesmo que elas sejam pré-menopausadas, pós-menopausadas ou gestantes (BOHANNON, 1998).

Sobel et al. *apud* Leon et al. (2002) descreveram sobre receptores de fucose (6-desoxi-galactose) presentes nas células do epitélio vaginal que ajudam na aderência de *Candida* a essas células. Visto que a fucose contém um isômero da glicose e atua como uma forma de sítio receptor para a adesão de *Candida*, é possível que o aumento da colonização pela levedura seja proporcional ao nível de glicose. A avidéz do receptor pode ser um reflexo dos níveis de glicose elevada no sangue e nos tecidos.

Segundo Foss et al. (2005) a hiperglicemia crônica tem influência no aparecimento das complicações do diabetes, devido à indução da glicação não-enzimática de proteínas. Tais proteínas sofrem alterações significantes nas paredes dos vasos, levando ao comprometimento do tecido local. Isso pode ocorrer com as proteínas do endotélio e do colágeno, por exemplo, acarretando em maior suscetibilidade às infecções.

Outros fatores também favorecem o aumento de infecções em diabéticos, como as complicações crônicas vasculares ou neurológicas, e as alterações da resposta imunológica, especialmente com relação à função dos neutrófilos, limitando a habilidade de quimiotaxia e de fagocitose dessas células quando comparados com indivíduos normais (LEON et al., 2002). Os mecanismos responsáveis por esses defeitos não são claros, e estão correlacionados com o diabetes descompensado (BOHANNON, 1998).

DIABETES EXPERIMENTAL

Diante da predisposição do indivíduo diabético a diferentes infecções, torna-se imprescindível uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da interação dos microorganismos com a hiperglicemia. Nesse sentido, o uso de modelos experimentais em animais tem extrema importância não só para a melhor compreensão desses mecanismos, mas também para outros estudos que envolvam as complicações causadas pelo diabetes (RIBEIRO, 2007).

Segundo Lerco et al. (2003), o diabetes experimental pode ser induzido em animais por vários mecanismos. Dentre os principais destaca-se: estresse, infecções, toxinas, ou manipulações, incluindo a pancreatectomia; lesões do sistema nervoso central; uso de hormônios anti-insulínicos; exposição à hidrocortisona ou ao hormônio adrenocorticotrópico (ACTH); indução por vírus e o uso de agentes químicos beta-citotóxicos, como a aloxana, a streptozotocina, a ditizona e soro anti-insulina.

Apesar dessa gama de mecanismos, os métodos químicos de supressão endócrina do pâncreas através do uso de agentes beta-citotóxicos são os que melhor exibem todos os eventos bioquímicos, hormonais e morfológicos que ocorrem durante e após a indução do estado diabetogênico (JORGE, 2003; LERCO et al., 2003). Esses agentes seletivamente destroem as células das ilhotas de Langerhans (CARVALHO, 2003).

A aloxana e a streptozotocina são os dois agentes químicos com citotoxicidade específica para as células beta mais estudados. Por ter baixa ação oncogênica e baixo custo, a aloxana vem sendo amplamente usada para a indução de diabetes experimental (LERCO et al., 2003). Pesquisadores em seus estudos com modelos experimentais de diabetes aloxânico obtiveram animais que apresentavam sintomas semelhantes aos encontrados no DM em humanos, tais como perda de peso corporal, polidipsia, poliúria, glicosúria, cetonúria, hiperglicemia e cetonemia (RIBEIRO, 2007).

A toxicidade da aloxana pode ser ocasionada pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), após o processo de auto-oxidação do ácido dialúrico, resultando na fragmentação do DNA destas células. O potencial da aloxana em gerar EROs é superior ao da streptozotocina, portanto o dano causado pela maior quantidade destas EROs atinge um maior número de células. Em função desta ação deletéria, uma única dose de aloxana é necessária para

induzir em ratos o DM tipo 1 (JORGE, 2003). Segundo Lima et al. (2001), a formação de peróxido de hidrogênio, induzida por aloxana, causa fragmentação do DNA das células produtoras de insulina e, conseqüentemente, DM. Estudos demonstraram que o efeito da aloxana sobre a secreção de insulina ocorre em dois estágios; inicialmente, há a ação estimulante com liberação rápida do hormônio, presumivelmente em virtude do influxo de íons de cálcio ao citosol das células beta, logo após, a secreção de insulina cessa completamente, mesmo durante a estimulação com altas doses de glicose, em decorrência da necrose de células beta pancreáticas.

JUSTIFICATIVA

Leon et al. (2002) têm sugerido que a CVV ocorre mais frequentemente em mulheres com diabetes. O aumento dos níveis de glicose, característico desta doença, leva ao surgimento de colonização e infecção por *Candida*.

Em decorrência do acometimento de milhões de mulheres anualmente, causando grande desconforto, interferindo nas relações sexuais e afetivas, e em virtude de o DM predispor o indivíduo a infecções bacterianas e fúngicas, o presente trabalho analisou a influência do diabetes no desenvolvimento e manutenção da CVV.

OBJETIVOS

GERAL

Verificar a influência do diabetes no desenvolvimento e manutenção da CVV.

ESPECÍFICOS

- Induzir diabetes experimental em ratas Wistar através da administração de aloxana (41 mg/kg) via endovenosa e acompanhar a manutenção da hiperglicemia e outras alterações características da doença.
- Induzir CVV por *C. albicans* a partir de uma suspensão previamente padronizada de um isolado vaginal nas concentrações entre 5×10^5 a 5×10^{10} UFC/mL (unidades formadoras de colônia/ mililitro) nos grupos controle e diabético.
- Realizar o controle da infecção dos grupos através de cultura vaginal em ágar Sabouraud dextrose-cloranfenicol e através da confecção de lâminas com esfregaços vaginais para coloração de Papanicolaou.
- Verificar aspectos da adesão da levedura no tecido vaginal das ratas diabéticas através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-FILHO, G.L.; PASSOS, M.R.L.; GOUVÊA, T.V.D. Candidíase. In: PASSOS, M.R.L. **Doenças sexualmente transmissíveis**. 4. ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1995.
- ÁLVARES, C.A.; SVIDZINSKI, T.I.E.; CONSOLARO, M.E.L. Candidíase Vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **J Bras Patol Med Lab**, v.43, p.319-327, 2007.
- BIBBO, M.; WIED, L.W. Microbiology and inflammation of the female genital tract. In: WIED, L.G.; KEEBLER, M.C.; KOSS, LG; REAGEN, W.J. **Compendium on Diagnostic Cytology**. 6. ed. Chicago, Illinois, 1990.
- BOHANNON, N.J.V. Treatment of vulvovaginal candidiasis in patients with diabetes. **Diabetes Care**, v.21, p.451-456, 1998.
- BROOKS, G.F.; BUTEL, J.S.; MORSE, S.A. Microbiologia Médica. In: JAWETZ, J.; MELNICK, J.L.; ADELBERG, E.A. **Microbiologia Médica**. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000.
- CALDERON, L. et al. Genetic susceptibility to vaginal candidiasis. **Med Mycol**, v.41, p.143-147, 2003.
- CARVALHO, E.N.; CARVALHO, N.A.S.; FERREIRA, L.M. Experimental model of induction of *diabetes mellitus* in rats. **Acta Cir Bras**, v.18, p.60-64, 2003.
- CHAFFIN, W.L. et al. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: Identification, function, and expression. **Microbiol Molec Biol Rev**, v.62, p.130-180, 1998.
- CHONG, P.P. et al. Genetic relatedness to *Candida* strains isolated from women with vaginal candidiasis in Malaysia. **J Med Microbiol**, v.52, p.657-666, 2003.
- CONSOLARO, M.E.L. et al. Correlation of *Candida* species and symptoms among patients with vulvovaginal candidiasis in Maringá, Paraná, Brazil. **Rev Iberoam Micol**, v.21, p.202-205, 2005.
- CORSELLO, S. et al. An epidemiological survey of vulvovaginal candidiasis in Italy. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v.110, p.66-72, 2003.
- CROCCO, E.I. et al. Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica *in vitro*: estudo de 1000 pacientes com candidíases superficiais. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.79, p.689-697, 2004.
- ESTEVES, J.A.; CABRITA, J.D.; NOBRE, G.N. **Micologia Médica**. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1990.
- FERRAZA, M.H.S.H. et al. Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com

- candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v.27, p.58-63, 2005.
- FIDEL, P.L.; SOBEL, J.D. Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. **Rev Clin Microbiol**, v.9, p.335-348, 1996.
- FOSS, N.T. et al. Dermatoses em pacientes com diabetes mellitus. **Revista de Saúde Pública**, v.39, p.677-682, 2005.
- GHANNOUM, M.A.; RADWAN, S.S. **Candida adherence to epithelial cells**. New York: New York Press, 1990.
- GOSWAMI, D. et al. Pattern of *Candida* species isolated from patients with diabetes mellitus and vulvovaginal candidiasis and their response to single dose oral fluconazole therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, p.2336-2342, 2005.
- GUYTON, A.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2002.
- HOLANDA, A.A.R., et al. Candidíase Vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante. **Rev Bras de Ginecol e Obstet**, v.29, p.03-09, 2007.
- JORGE, A.P. **Efeito Insulino-mimético do Canferol 3,7-o-(a)-Idiramnosídeo na Glicemia e na Captação da 2-[14c (u)]-deoxi-d-glicose em Músculo Sóleo de Ratos**. 2003. 92 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- KALO-KLEIN, A.; WITKIN, S.S. Regulation of the immune response to *Candida albicans* by monocytes and progesterone. **Am J Obstet Gynecol**, v.164, p.1351-1354, 1991.
- KAUSHIC, C. et al. Effects of estradiol and progesterone on susceptibility and early immune responses to *Chlamydia trachomatis* infection in the female reproductive tract. **Infect Immun**, v.68, p.4207-16, 2000.
- KURTZMANN, C.P.; FELL, J.W. **The Yeast: A taxonomic Study**. 4. ed. Amsterdam: Elsevier, 1998.
- LACAZ, CS. **Candidíases**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1980.
- LEON, E.M. et al. Prevalence and risk factors for vaginal *Candida* colonization in women with type 1 and type 2 diabetes. **BMC Infectious Diseases**, v.2, p.1-6, 2002.
- LERCO, M.M. et al. Caracterização de um Modelo Experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.18, p.132-142, 2003.

- LIMA, M.A. et al. Análise Quantitativa das células das ilhotas pancreáticas em ratos sob efeito de Aloxana. **Medicina**, v.34, 308-314, 2001.
- MALAZI, O.T. et al. Vulvovaginal Candidiasis and its Related Factors in Diabetic Women. **Taiwan J Obstet Gynecol**, v.46, p.399-404, 2007.
- NÓBREGA, A.R. et al. Nível de conhecimento de pacientes portadores de Diabetes Mellitus acerca da patologia e suas complicações. **Arq Bras de Endocrinol Metab**, v.49, p.S939, 2005.
- NOHMI, T. et al. Supression of anti-Candida activity of murine neutrophils by progesterone in vitro: a possible mechanism in pregnant women's vulnerability to vaginal candidiasis. **Microbiol Immunol**, v.39, p.405-409, 1995.
- PICHOVÁ, I. et al. 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.
- RIBEIRO, C.; OLIVEIRA, C.A.M.; MELLO, M.A.R. Exercício e prevenção do diabetes mellitus: importância do modelo experimental utilizando ratos. **Motriz**, v.13, p.72-77, 2007.
- RIPPON, J.W. **Medical Micology**: The pathogenic fungi and the pathogenic actimonymycetes. Philadelphia: Saunders, 1974.
- ROSA, M.I.; RUMEL, D. Fatores associados a candidíase vulvovaginal: estudo exploratório. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v.26, p.65-70, 2004.
- RYLEY, J.F.; MCGREGOR, S. Quantification of vaginal *Candida albicans* infections in rodents. **J Med Vet Mycol**, v.24, p.455-460, 1986.
- SALVATORE, CA. **Candidiases vulvovaginal**. In LACAZ, C.S. Candidíases. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1980.
- SCHMID, J.; VOSS, E.; SOLL, D.R. Computer assisted methods for assessing strain relatedness in *Candida albicans* by fingerprinting with the moderately repetitive sequence Ca3. **J Clin Microbiol**, v.28, n.6, p.1236-1243, 1990.
- SOBEL, J.D. Candidal vulvovaginitis. **Clin Obstet Gynecol**, v.36, p.153-12, 1993.
- SOBEL, J.D. Vaginal infections in adult women. **Med Clin North Am**, v.74, p.1575-1602, 1990.
- SOBEL, J.D. et al. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. **Am J Obstet Gynecol**, v.178, p.203-211, 1998.
- ZDOLSEK, B. et al. Vaginal microbiological flora and sexually transmitted diseases in women with recurrent or current vulvo vaginal candidiasis. **Infection**, v.23, p.81-84, 1995.

ZIARRUSTA, G.B. Vulvovaginitis candidiásica. **Rev Iberoam Micol**, v.19, p.22-24, 2002.

CAPÍTULO II

**Artigo: “EFFECT OF EXPERIMENTAL DIABETES ON THE DEVELOPMENT AND
MAINTENANCE OF VULVOVAGINAL CANDIDIASIS IN FEMALE RATS”**

**EFFECT OF EXPERIMENTAL DIABETES ON THE DEVELOPMENT AND
MAINTENANCE OF VULVOVAGINAL CANDIDIASIS IN FEMALE RATS**

Márcia A. CARRARA, Biologist; Roberto B. BAZOTTE, PhD; Lucélia DONATTI, PhD;
Terezinha I.E. SVIDZINSKI, PhD; Márcia E.L. CONSOLARO, PhD; Eliana V. PATUSSI, PhD;
Márcia R. BATISTA, PhD

From the Department of Clinical Analyses, Postgraduate Program in Clinical Analyses, State University of Maringá, Maringá, PR, Brazil (M.A. Carrara, T.I.E. Svidzinski, M.E.L. Consolaro, E.V. Patussi and M.R. Batista); and Department of Pharmacy and Pharmacology, State University of Maringá, Maringá, PR, Brazil (R.B. Bazotte); and Center of Electron Microscopy, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil (L. Donatti).

Reprints:

Márcia Aparecida Carrara: Laboratory of Clinical Analyses – UEM, Colombo Avenue, 5790 – 87020-900, Maringá, PR, Brazil. Phone: 55-44-3261-4801, e-mail: marcia.carrara@yahoo.com.br

(No financial support)

(Reprints not be available)

Word count (text): 1403 words

Word count (abstract): 145 words

CONDENSATION: In this study we develop an experimental model of diabetes in female rats to verify its influence on the development and maintenance of vulvovaginal candidiasis.

Effect of experimental diabetes on the development and maintenance of vulvovaginal candidiasis in female rats

Márcia A. CARRARA, Roberto B. BAZOTTE, Lucélia DONATTI, Terezinha I.E. SVIDZINSKI, Márcia E.L. CONSOLARO, Eliana V. PATUSSI, Márcia R. BATISTA.

ABSTRACT

OBJECTIVE: To analyse the influence of the experimental diabetes on the development and maintenance of vulvovaginal candidiasis.

STUDY DESIGN: The animals were divided into control group (C group) and experimental diabetic group (D group) and were weighed in the beginning and at the end of experiments. Diabetes was induced by an endovenous injection of alloxan (41 mg/kg). After a week, the diabetes confirmation was done by glycemic evaluation. The infection vaginal was induced by *Candida albicans* yeasts and after a week the infection was detected by vaginal culture and smears stained by Papanicolaou. The infection control was made for a period of 5 weeks.

RESULTS: The results pointed to different glycemias ($P = 0.0001$) between the C (74.8 ± 2.6 mg/dL) and D groups (543.1 ± 12.1 mg/dL) and a significant body weight decrease ($P = 0.0072$) (227.6 ± 4.77 g and 204 ± 6.39 g to C and D group, respectively). Moreover, the culture, Papanicolaou smears and scanning electron microscopy (SEM) demonstrated persistence of infection during the study period only in group D.

CONCLUSION: The diabetes mellitus was favorable to the development and maintenance of VVC by *Candida albicans*.

Key words: alloxan, *Candida albicans*, experimental diabetes, female rats, vulvovaginal candidiasis

BACKGROUND AND OBJECTIVE

Vulvovaginal candidiasis (VVC) is caused by the abnormal growth of yeast-like fungi on the mucosa of the female genital tract. It is an infection of vulva and vagina, caused by commensal yeast inhabiting the vaginal as well as the digestive and respiratory mucosas. The yeasts become pathogenic when the colonization site on the host is favorable to their development.¹ VVC and oral candidiasis are considered the most common form of opportunistic fungal infection, and the transformation from the asymptomatic to the symptomatic condition indicates a transition from the saprophyte to the pathogenic form.²

VVC is clinically characterized by the occurrence of intense vulvar itching, leucorrhea, dyspareunia, dysuria, edema and vulvovaginal erythema. Moreover, itching is considered the most important symptom when the VVC is compared to vulvovaginites of other etiologies.²

The major source of vaginal yeasts is the gastrointestinal tract, through a process called endogenous transference. The yeasts are carried through self-inoculation to the vagina, where they adapt and develop, and may cause immediate disturbances or make up a reservoir for future infections. The development of the infection is favored by several factors, such as: previous colonization by the yeast, immunosuppressive diseases, diabetes mellitus, pregnancy, therapy with corticoids, antibiotics or estrogens, small traumas during sexual intercourse, use of too tight or synthetic clothes, and nutrition habits.³

Diabetes mellitus is favorable to bacterial and fungal infections, including those caused by species of *Candida*. Several investigators have suggested that VVC occurs more frequently in diabetic women.^{4,5} According to Holanda et al.,² uncontrolled diabetes mellitus promotes metabolic alterations, such as increased levels of glycogen, which can be significant for the sprout of colonization and infection by *Candida*. This increased glycogen levels decreases

vaginal pH, facilitating the development of VVC.⁶

According to Foss et al.,⁷ chronic hyperglycemia influences the appearance of diabetic complications due to the induction of non-enzymatic glycation of proteins. Such proteins suffer significant alterations on the walls of the vessels, leading to commitment of the local tissue. This can occur with endothelial proteins and collagen, for instance, resulting in greater susceptibility to infections.

Other factors also contribute to the development of infections in diabetic subjects, such as chronic vascular or neurologic complications, changes in the immunologic response, especially reduction of chemotaxis and phagocytosis of neutrophils. Furthermore, epithelial and mucosal cells of diabetic subjects show an increase in the adherence of some pathogens such as *Candida albicans* in the buccal and vaginal mucosae and *Escherichia coli* in the cells of the urinary epithelium.⁷

Animal models of experimental VVC have been extremely useful in the identification of factors related to infection susceptibility.^{8,9,10,11}

Since VVC afflicts millions of women, causing great discomfort, interfering with sexual and affective relations this work has the purpose to analyse the influence of the diabetes on the development and maintenance of VVC in female rats.

MATERIALS AND METHODS

Animals

In this study 18 adult female Wistar rats weighting 200-300 g, aging about three months, supplied by the Central Animal House of the State University of Maringá (Brazil) were used. The manipulation followed the Brazilian law on the protection of animals. The protocol was approved

by the state animal welfare committee (050/2006).

Diabetes induction

After one week of adaptation 11 female rats (D group) received an endovenous injection (caudal vein) of alloxan (41 mg/kg) (Alloxan monohydrate 98% - Sigma). The C group (7 rats) received an endovenous injection (caudal vein) of saline solution (0.9% NaCl).

After an additional week, a sample of blood from the tail was collected from both groups for glycemia evaluation using the glucose oxidase method. The blood was collected in tubes containing anti-clotting agent (Fluoride EDTA). After the blood collection the tails were cauterized to facilitate cicatrization. Severe diabetes (glycemia > 450 mg/dL) were obtained in 8 female rats and these animals were used to investigate the development and maintenance of VVC in female rats. These animals were weighed in the beginning and at the end of experiments.

Induction and control of infection

After the confirmation of diabetes in the D group, the infection vaginal was induced by *Candida albicans* yeasts previously standardized (concentrations of the about 5×10^8 yeasts/mL) in both groups.

After seven days, the control of the infection development began with the collections and cultures of vaginal secretions in Sabouraud dextrose-chloramphenicol agar (Sigma Chemical, ST. Louis, USA) for 24-48 hours at 25°C. This control was carried out weekly for five weeks of infection. In addition to culture, the vaginal material was prepared as slide blades and used for Papanicolaou cytology.

Electron Microscopy

After five weeks of infection, one infected rat was killed using ether and the vagina was excised. After washing, it was fixed in glutaraldehyde solution (2.5%) dissolved in 0.1M cacodylate buffer (Sigma Chemical, ST. Louis, USA) and dehydrated in ascending series of alcohol. The critical point was obtained in Balzers CPD-010 (Balzers Instruments, Balzers, Liechtenstein) with carbonic gas. Metalization with gold was done in Balzers SCD-030 (Balzers Instruments, Balzers, Liechtenstein). Documentation was carried out in a JEOL-JSM 6360 LV scanning electron microscope (Jeol Ltda, Tokyo, Japan) at the Center of Electron Microscopy – Federal University of Paraná, Brazil.

Statistics

The data are presented as mean values \pm SEM. Data were analyzed by Student's t-test for unpaired data using the GraphPad Prism 4.0 program. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

The induction of experimental diabetes pointed to significantly different glycemia between the control (74.8 ± 2.6 mg/dL, n=7) and the diabetic group (543.1 ± 12.1 mg/dL, n=8), confirming the action of alloxan (Figure 1).

There was also a reduction ($P = 0.0072$) in the body weight (Figure 2) between the control group (227.6 ± 4.77 g, n=7) and the diabetic group (204.0 ± 6.39 g, n=8). Moreover increased water ingestion and diuresis were observed in the D group (not shown).

Furthermore D group, but not C group, showed persistent growth of the colonies of vaginal yeasts during the five weeks of observation. This vaginal secretion was slightly

condensed and milky. In agreement, Papanicolaou staining showed the presence of yeast and pseudohyphae in the D group (Figure 3). In the C group culture and Papanicolaou were negative.

Yeast and vaginal epithelium of the diabetic rats were evaluated by scanning electron microscopy (SCEM). As shown in figure 4 many adherent yeasts (panel A) and areas of contact appeared as regions of continuity, with interdigitations and fibrils connecting *Candida albicans* to the epithelium (panel B and C). More specifically, the adhesion appears as strong stretched strands bridging the yeasts to the vaginal epithelium surface. In addition the intimate association with the epithelial cell can be observed (panel B and C).

COMMENT

The determinations of glycemia gave normal values for the C group. However, the D group shown glycemia values above 500 mg/dL (Figure 1), characterizing the typical hyperglycemia of diabetes mellitus.

The vaginal samples collected from the C group indicated absence of VVC development, since the female rats did not show discharge and hyperemia at the vaginal region. In contrast, D group had positive growth of yeast colonies all along the follow-up period (five weeks). D group also showed slightly condensed and milky secretion, typical of candidiasis, and hyperemia at the vaginal region.

Diabetes mellitus causes metabolic alterations, such as hyperglycemia, which is highly significant for the appearance of colonization and infection by *Candida albicans*. The hyperglycemia leads to an increased vaginal glycogen levels, an abundant source of substrate for the fungus that according to Ferraza et al.,⁶ decreases vaginal pH and facilitates VVC development.

Papanicolaou cytology, according to Takahashi¹² and Bibbo,¹³ can be used to follow

either phases of the reproductive cycle or yeast infection. The Papanicolaou staining technique depends on the affinity of acidic stains (light green eosin and orange G) for basic plasma constituents, for instance keratin. Through this staining, the cells of the vaginal squamous epithelium can be differentiated by their morphology and color. When the Papanicolaou staining was applied to the vaginal secretion from rats of D group, positive yeast and pseudohyphae were evidenced.

In the SCEM to the vagina of the D group, the intimate association of the yeast with the epithelial cell can be seen. The adhesion appears as strong stretched strands bridging the yeasts to the vaginal epithelium surface, demonstrating the persistent infection.

Finally, considering that few studies investigated the influence of diabetes on VVC, this work reached the initial goal of creating an experimental model to study the effect of diabetes on the development and maintenance of the VVC in female rats.

REFERENCES

- 1- Ziarrusta GB. Vulvovaginal candidiasis. Rev Iberoam Micol 2002;19:22-4.
- 2- Holanda AAR, Fernandes ACS, Bezerra CM et al. Vulvovaginal candidiasis: symptomatology, risk factors and concomitant anal colonization. Rev Bras Ginecol Obstet 2007;29:3-9.
- 3- Fernandes CE, Machado RB. Etiopathogenic aspects, diagnostic and therapeutics of the vulvovaginal candidiasis. Rev Bras Med 1996;7:100-4.
- 4- Bohannon NJ. Treatment of vulvovaginal candidiasis in patients with diabetes. Diabetes Care 1998;21:451-6.
- 5- Zdolsek B, Hellberg D, Fröman G, Nilsson S, Mårdh PA. Vaginal microbiological flora and sexually transmitted diseases in women with recurrent or current vulvovaginal candidiasis. Infection 1995;23:81-4.
- 6- Ferrazza MHSH, Maluf MLF, Consolaro MEL, Shinobu CS, Svidzinski TIE, Batista MR. Characterization of yeasts isolated from the vagina and their association with vulvovaginal candidiasis in two cities of the South of Brazil. Rev Bras Ginecol Obstet 2005;27:58-63.
- 7- Foss NT, Polon DP, Takada MH, Foss-Freitas MC, Foss MC. Dermatitis in patients with diabetes mellitus. Rev Saúde Pública 2005;39:677-82.
- 8- Calderon L, Williams R, Martinez M, Clemons KV, Stevens DA. Genetic susceptibility to vaginal candidiasis. Med Mycol 2003;41:143-7.
- 9- Nohmi T, Abe S, Dobashi K, Tansho S, Yamaguchi H. Suppression of anti-*Candida* activity of murine neutrophils by progesterone in vitro: a possible mechanism in pregnant women's vulnerability to vaginal candidiasis. Microbiol Immunol 1995;39:405-9.
- 10- Schmid, J, Voss, E and Soll, DR. Computer assisted methods for assessing strain relatedness

in *Candida albicans* by fingerprinting with the moderately repetitive sequence Ca3. J Clin Microbiol 1990;28:1236-43.

11- Sobel JD, Faro S, Force RW et al. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. Am J Obstet Gynecol 1998;178:203-11.

12- Takahashi, M. *Color atlas of cancer cytology*. São Paulo: Manole;1982:164-80.

13- Bibbo, M. *Comprehensive cytopathology*. Philadelphia: W.B. Saunder Company;1997:101-24.

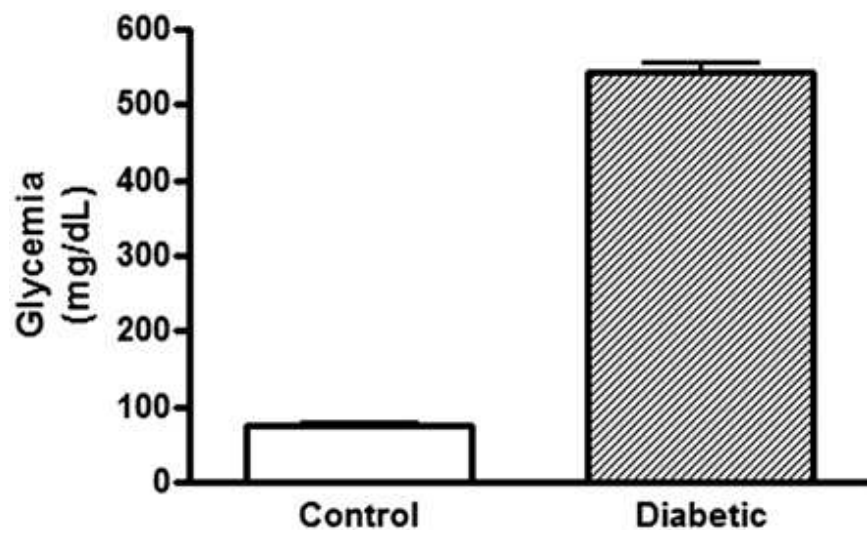


Figure 1- Glucose concentration (mg/dL) in the C (74.8 ± 2.6 , $n=7$) and D group (543.1 ± 12.1 , $n=8$). $P = 0.0001$. Values are expressed as mean \pm SEM.

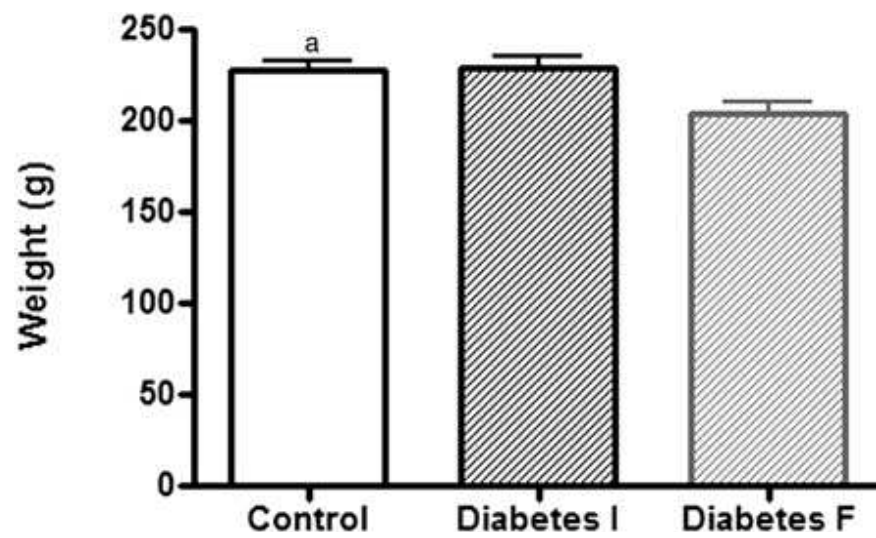


Figure 2- Body weight (g) of the non diabetic (Control group), initial diabetes (Diabetes I) and five-week of diabetes (Diabetes F). ^aP = 0.0072 (Control group, n=7) vs. (Diabetes F group, n=8). Values are expressed as mean \pm SEM.

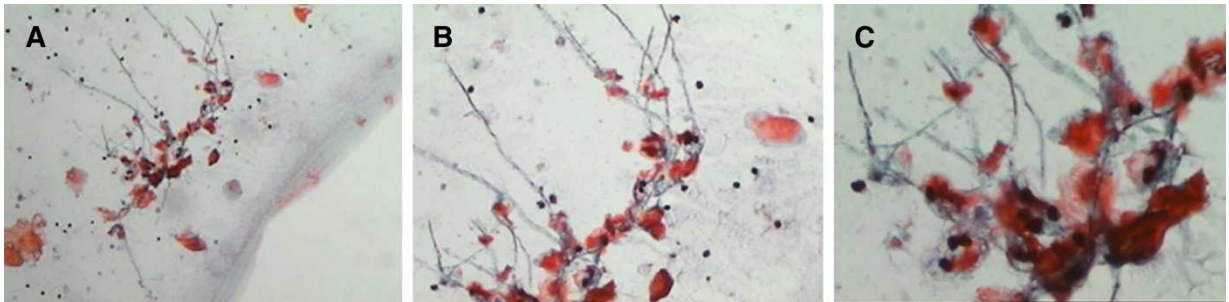


Figure 3- Results of Papanicolaou staining under 10X (A), 20X (B) and 40X (C) objectives, respectively, in the diabetic rat, demonstrating the presence of yeasts and the pseudohyphae.

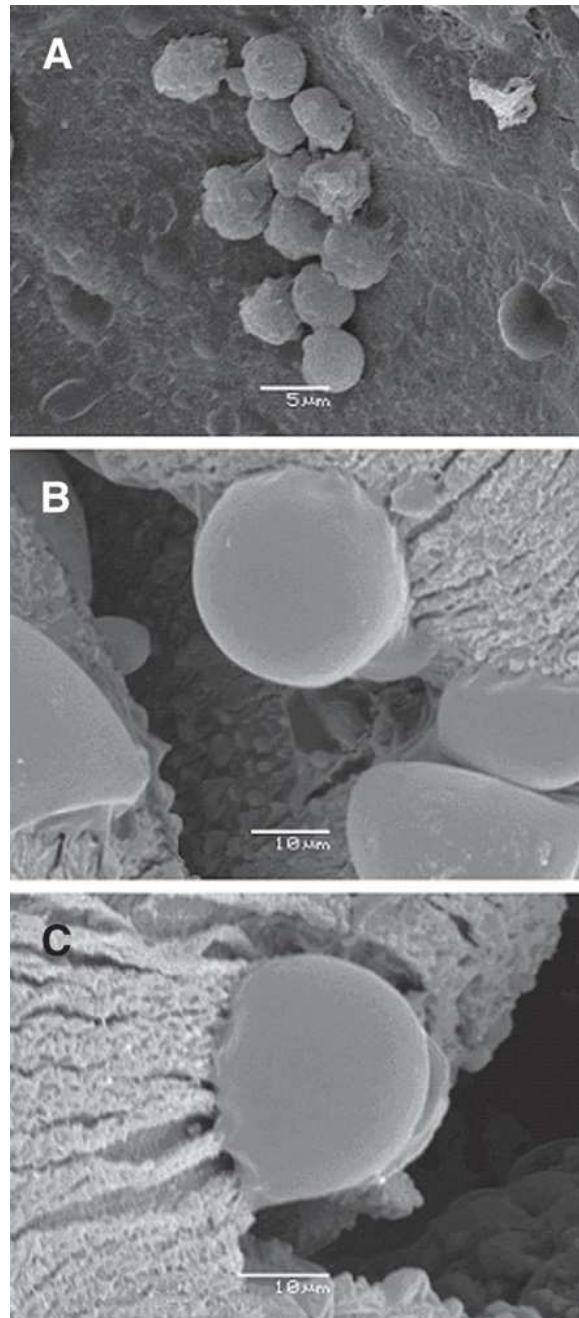


Figure 4- Yeast and vaginal epithelium of the diabetic rat by scanning electron microscopy (SEM). In panel A many adherent yeasts can be observed, and in panel B and C areas of contact appeared as regions of continuity, with strong stretched strands bridging between *Candida albicans* and the vaginal epithelium surface. The intimate association with the epithelial cell can be seen.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

O presente trabalho experimental permitiu concluir que:

- 1) A supressão da função endócrina do pâncreas pela aloxana é bastante eficiente em desenvolver um estado diabetogênico, já que exhibe os mecanismos bioquímicos, hormonais e morfológicos que ocorrem no diabetes.
- 2) O uso de modelos experimentais em animais são extremamente importantes tanto para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no diabetes, como para a identificação de fatores relativos à susceptibilidade a infecção.
- 3) O diabetes experimental possivelmente levou ao aumento da glicose vaginal das ratas, o que ocasionou possível redução do pH. A vagina desses animais tornou-se então, ambiente propício para a instalação, desenvolvimento e manutenção das leveduras de *Candida albicans*.
- 4) A citologia de Papanicolaou e a cultura de secreção vaginal foram importantes ferramentas para o acompanhamento da infecção por *C. albicans*.
- 5) A MEV permitiu visualizar a íntima adesão entre a levedura de *C. albicans* e o epitélio vaginal de rata diabética.

PERSPECTIVAS FUTURAS

O DM é um distúrbio metabólico crônico, caracterizado por níveis elevados de glicose no sangue. A hiperglicemia é responsável pelo surgimento das complicações da doença predispondo o indivíduo a infecções fúngicas. O presente modelo experimental proposto configura-se uma ferramenta de extrema importância para a melhor compreensão da influência do diabetes no desenvolvimento e manutenção de candidíase vulvovaginal.

Além disso, a criação desse modelo experimental permite a realização de outros estudos, abrindo novos campos de pesquisa. A reprodução desse modelo possibilitará a realização de testes com extratos de plantas, com formulações ou com outras drogas que possam combater infecções causadas por *C. albicans* em pacientes diabéticas.