



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**MARIANA ARAÚJO PAULO DE MEDEIROS**

**ASPECTOS DE PATOGENICIDADE E RELACIONAMENTO GENÉTICO DE  
ISOLADOS CLÍNICOS VAGINAIS E ANAIS DE *Candida albicans*  
ORIUNDOS DE PACIENTES COM CANDIDÍASE VULVOVAGINAL**

**NATAL / RN**

**2013**

**MARIANA ARAÚJO PAULO DE MEDEIROS**

**ASPECTOS DE PATOGENICIDADE E RELACIONAMENTO GENÉTICO DE  
ISOLADOS CLÍNICOS VAGINAIS E ANAIS DE *Candida albicans*  
ORIUNDOS DE PACIENTES COM CANDIDÍASE VULVOVAGINAL**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Orientador:** Prof. Dr. Guilherme Maranhão Chaves

**NATAL / RN**

**2013**

### CATALOGAÇÃO NA FONTE

M488a

Medeiros, Mariana Araújo Paulo de.

Aspectos de patogenicidade e relacionamento genético de isolados clínicos vaginais e anais de candida albicans oriundos de pacientes com candidíase vulvovaginal / Mariana Araújo Paulo de Medeiros, 2013.

204f.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Maranhão Chaves.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

1. Candidíase vulvovaginal – Dissertação. 2. Candida albicans – Dissertação. 3. Fatores de virulência – Dissertação. 4. Genotipagem – Dissertação. I. Chaves, Guilherme Maranhão. II. Título.

RN-UF/BS-CCS

CDU: 616.97(043.3)

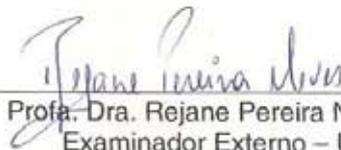
MARIANA ARAÚJO PAULO DE MEDEIROS

**ASPECTOS DE PATOGENICIDADE E RELACIONAMENTO GENÉTICO  
DE ISOLADOS CLÍNICOS VAGINAIS E ANAIS DE *Candida albicans*  
ORIUNDOS DE PACIENTES COM CANDIDÍASE VULVOVAGINAL**

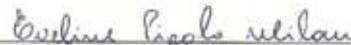
**Banca Examinadora:**



Prof. Dr. Guilherme Maranhão Chaves  
Presidente – UFRN



Profa. Dra. Rejane Pereira Neves  
Examinador Externo – UFPE



Profa. Dra. Eveline Pipolo Milan  
Examinador Interno – UFRN

Natal, 27 de março de 2013

**NATAL / RN**

**2013**

## DEDICATÓRIA

A todos que de alguma forma contribuíram para a construção deste trabalho e estiveram ao meu lado, em especial meus pais, pelo amor, carinho, confiança e incentivo incondicionais.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que permitiu todos os acontecimentos em minha vida, iluminando meus caminhos e me dando forças para seguir em frente e superar as dificuldades;

Aos meus pais, **Lúcio e Maria da Apresentação**, que acompanharam toda a minha trajetória, me incentivando e sempre acreditando no meu potencial, apoiando as minhas decisões, me dando todo o suporte, amor e carinho, além de valores inestimáveis, tenho muito orgulho de tê-los como pais;

Ao meu avô **Paulo**, minha avó **Santana** (*in memoriam*) e minha tia-avó **Socorro**, que ajudaram na minha formação como pessoa e como profissional, sempre com palavras doces, de força e incentivo;

Aos meus irmãos, **Gabriel e João Bernardo**, que presenciaram dias difíceis e estressantes, me poupando sempre que necessário;

Ao meu namorado, **Wesley**, que me ajudou a trilhar o caminho certo, estando ao meu lado, me incentivando, acreditando no meu sucesso e enfrentando comigo os momentos difíceis desta jornada, dando cor e alegria aos meus dias;

À minha segunda família, **Oberusa, Jéssica e Helder**, pelo acolhimento, palavras reconfortantes e “feijoadas” para aquecer o coração;

A todos os **meus amigos e familiares**, que sempre me encorajaram e me incentivaram a seguir em frente;

Ao meu orientador, **Prof. Guilherme Chaves**, pela grande oportunidade que me deu de conhecer e pesquisar o mundo fascinante da Micologia; e por me ajudar a construir este trabalho, sempre disposto e interessado, acrescentando sua experiência e conhecimento, que muito colaboraram para enriquecê-lo e por confiar na minha capacidade; com certeza um exemplo de perseverança e coragem;

Ao **Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas** da **Universidade Federal do Rio Grande do Norte**, pela oportunidade do curso de mestrado e à **FAPERN**, pelo apoio financeiro (Edital 013/2009);

À **Prof.<sup>a</sup> Eveline**, por todo o apoio dado à implementação do Laboratório de Micologia Médica e Molecular, nos cedendo parte das cepas deste estudo e sempre disposta a ajudar no que fosse necessário, nos passando seus conhecimentos;

Às **pacientes**, que aceitaram participar do estudo, indispensáveis à realização desta pesquisa;

À **Dr.<sup>a</sup> Conceição, prof. Edilson e médicos residentes** da Maternidade Escola Januário Cicco, por toda a ajuda e suporte durante a coleta das amostras clínicas deste trabalho;

Ao **Laboratório Especial de Micologia**, pela concessão do programa GelCompar II em momento decisivo, permitindo a concretização de parte importante deste trabalho;

À **Prof.<sup>a</sup> Telma**, chefe do DACT, que sempre incentivou e apoiou a minha qualificação, como servidora do DACT, bem como a de todos os servidores deste departamento, prezando pelo bem-estar e crescimento profissional dos mesmos;

Ao **Prof. Iveraldo**, por seus preciosos conselhos, sensatez, bondade e honestidade, sempre feliz com as minhas conquistas e colaborando no que fosse preciso;

À **Prof.<sup>a</sup> Maiza**, que sempre me apoiou e incentivou a minha qualificação;

À **Ana Patrícia**, pela ajuda imprescindível na realização deste trabalho, companheira responsável e dedicada nas coletas e experimentos;

À **Marília**, pela inestimável ajuda no momento mais difícil desta jornada, dividindo comigo as tarefas do laboratório e pela alegria que contagia a todos;

À **Luanda**, companheira de trabalho e de mestrado, pela amizade e apoio em todas as horas, dividindo comigo alegrias e tristezas e estando sempre à disposição para ajudar;

A todos os **amigos do Laboratório de Micologia Médica e Molecular e da pós-graduação**, em especial Plínio, Rafaela, Andressa, Elizabeth, Alysson, Diana, Luciana e Vitor, que acompanharam a realização desta pesquisa, dando apoio e incentivo.

*“Sabemos o que somos, mas não sabemos o que  
poderemos ser”.*

William Shakespeare

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	21
2	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	25
2.1	<i>Candida albicans</i> , PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA .....	25
2.1.1	<b>Capacidade de aderência como fator de virulência em <i>C. albicans</i></b> .....	26
2.1.2	<b>Atividade de proteinase como fator de virulência em <i>C. albicans</i></b> .....	27
2.1.3	<b>Morfogênese como fator de virulência em <i>C. albicans</i></b> .....	30
2.1.4	<b>Biofilme como fator de virulência em <i>C. albicans</i></b> .....	33
2.2	<b>CANDIDÍASE VULVOVAGINAL (CVV)</b> .....	38
2.2.1	<b>Quadro clínico x imunidade</b> .....	39
2.2.2	<b>Formas de transmissão da candidíase vulvovaginal</b> .....	41
2.2.3	<b>Fatores predisponentes</b> .....	42
2.3	<b>TIPAGEM DE CEPAS DE <i>C. albicans</i></b> .....	44
2.3.1	<b>Genotipagem ABC</b> .....	46
2.3.2	<b>Genotipagem por microssatélites</b> .....	48
2.3.3	<b>RAPD</b> .....	50
2.3.4	<b>Tipagem de cepas de <i>C. albicans</i> x candidíase vulvovaginal</b> .....	50
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	54
3.1	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	54
3.2	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	54
4	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	55
4.1	<b>TIPO DE ESTUDO</b> .....	55
4.2	<b>OBTENÇÃO DAS CEPAS DE <i>C. albicans</i> AVALIADAS NESTE ESTUDO</b> .....	55
4.2.1	<b>Isolados de <i>C. albicans</i> estocados em banco de micro-organismos</b> .....	55
4.2.1.1	Verificação de viabilidade, pureza e identificação fenotípica dos isolados de <i>C. albicans</i> estocados em banco de micro-organismos .....	56
4.2.2	<b>Isolados clínicos de <i>C. albicans</i> obtidos recentemente</b> .....	57
4.2.2.1	População do estudo .....	57
4.2.2.2	Coleta de dados .....	57
4.2.2.3	Coleta das amostras .....	57
4.2.2.4	Processamento das amostras .....	58
4.2.2.5	Armazenamento das leveduras isoladas .....	59
4.2.2.6	Critério de inclusão das leveduras isoladas .....	59
4.3	<b>IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS ISOLADAS</b> .....	59
4.3.1	<b>Micromorfologia</b> .....	59
4.3.2	<b>Triagem fenotípica de <i>C. dubliniensis</i> através do teste de tolerância à temperatura de 42°C</b> .....	60
4.3.3	<b>Triagem fenotípica de <i>C. dubliniensis</i> através do teste do caldo hipertônico</b> .....	60
4.3.4	<b>Prova de assimilação de hidratos de carbono (auxanograma)</b> .....	60
4.3.5	<b>Prova de fermentação de açúcares (zimograma)</b> .....	61

4.3.6	<b>Cepas de referência</b>	62
4.4	ANÁLISE FENOTÍPICA DE <i>C. albicans</i> QUANTO AOS DIFERENTES FATORES DE VIRULÊNCIA .....	62
4.4.1	<b>Caldo NGY para padronização do inoculo</b> .....	62
4.4.2	<b>Ensaio de aderência de <i>C. albicans</i> a células epiteliais humanas</b> .....	62
4.4.3	<b>Ensaio para detecção de atividade de proteinase em <i>C. albicans</i></b> .....	63
4.4.4	<b>Ensaio de morfogênese de <i>C. albicans</i> em meio líquido</b> .....	64
4.4.5	<b>Formação de biofilme</b>	64
4.4.5.1	Coloração do biofilme pelo cristal violeta	65
4.4.6	<b>Cepas de referência</b> .....	66
4.5	TIPAGEM MOLECULAR .....	66
4.5.1	<b>Extração do DNA</b> .....	66
4.5.2	<b>Quantificação do DNA</b> .....	66
4.5.3	<b>Reações de PCR</b> .....	67
4.5.3.1	Genotipagem ABC	67
4.5.3.2	Genotipagem por microsatélites e RAPD	67
4.5.4	<b>Eletroforese em gel de agarose</b> .....	68
4.5.5	<b>Cepas de referência para os métodos de genotipagem</b> .....	69
4.5.6	<b>Avaliação da similaridade dos padrões de bandas</b> .....	69
4.6	<b>Análise estatística dos resultados</b> .....	70
5	<b>RESULTADOS</b> .....	71
5.1	OBTENÇÃO DAS CEPAS DE <i>C. albicans</i> AVALIADAS NESTE ESTUDO .....	71
5.2	AVALIAÇÃO DOS SINAIS E SINTOMAS, FATORES PREDISPOANTES E USO DE ANTIFÚNGICOS .....	76
5.3	EXAME DIRETO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS (SECREÇÃO VAGINAL E SECREÇÃO ANAL) .....	80
5.4	CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA (UFC) PRESENTES NAS AMOSTRAS CLÍNICAS (SECREÇÃO VAGINAL E SECREÇÃO ANAL) .....	83
5.5	ANÁLISE FENOTÍPICA DE <i>C. albicans</i> QUANTO AOS DIFERENTES FATORES DE VIRULÊNCIA .....	87
5.5.1	<b>Capacidade de aderência de <i>C. albicans</i></b> .....	87
5.5.2	<b>Produção de proteinases aspárticas secretadas (Saps) de <i>C. albicans</i></b> .....	92
5.5.3	<b>Morfogênese de <i>C. albicans</i> em meio líquido</b> .....	96
5.5.4	<b>Formação de biofilme</b> .....	104
5.6	AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE OS FATORES DE VIRULÊNCIA .....	109
5.7	AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DOS SINAIS E SINTOMAS, DOS FATORES PREDISPOANTES E DO USO DE ANTIFÚNGICOS COM OS FATORES DE VIRULÊNCIA .....	112
5.8	GENOTIPAGEM DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>C. albicans</i> .....	115
5.8.1	<b>Genotipagem ABC</b> .....	115
5.8.2	<b>Genotipagem por microsatélites e RAPD</b> .....	118
5.9	AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE GENÓTIPOS ABC E FATORES DE VIRULÊNCIA .....	129
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	130

<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>149</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>150</b>
	<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>172</b>
	<b>APÊNDICE B .....</b>	<b>173</b>
	<b>APÊNDICE C (Artigo a ser submetido) .....</b>	<b>174</b>
	<b>ANEXO A .....</b>	<b>204</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Aspecto clínico de candidíase vulvovaginal (CVV).....38
- Figura 2.** (A) Coloração verde no meio cromogênico CHROMagar Candida® após 72h de incubação, sugestiva de *Candida albicans* ou *Candida dubliniensis* (técnica dos 7 pontos). (B) Aspecto micromorfológico de *Candida albicans*/*Candida dubliniensis* no Ágar Fubá com Tween 80 após incubação a 30°C, 72h (400 x de magnificação). A seta preta representa um clamidoconídio, a seta verde representa uma hifa verdadeira e a seta branca representa um aglomerado de blastoconídios. Fonte: Acervo pessoal.....70
- Figura 3.** (A) Prova de fermentação de açúcares (zimograma) de cepa de *Candida albicans*, apresentando fermentação, com produção de gás, dos açúcares dextrose, maltose, sacarose e galactose. (B) Prova de assimilação de fontes de carbono (auxanograma) de cepa de *Candida albicans*, apresentando assimilação, visualizada pela presença de halo de crescimento, dos açúcares dextrose, sacarose, maltose, xilose e galactose. Fonte: Acervo pessoal.....70
- Figura 4.** (A) Teste do caldo hipertônico, após 96h de incubação. O tubo à esquerda, sem turvação, representa uma cepa de *Candida dubliniensis* (resultado negativo), enquanto o tubo à direita representa uma cepa de *Candida albicans*, com turvação do meio SDA com 6,5% de NaCl (resultado positivo). (B) Teste de tolerância à temperatura de 42 °C após 48h de incubação. O tubo à esquerda, com crescimento em YPD, representa uma cepa de *Candida albicans*, enquanto o tubo à direita representa uma cepa de *Candida dubliniensis*, com ausência de crescimento em YPD. Fonte: Acervo pessoal.....71
- Figura 5.** Distribuição da quantidade de sinais e sintomas apresentados pelas pacientes do estudo quando as mesmas apresentaram cultura de secreção vaginal positiva para *Candida albicans* (27).....75
- Figura 6.** Distribuição da quantidade de fatores predisponentes apresentados pelas pacientes do estudo quando as mesmas apresentaram cultura de secreção vaginal positiva para *Candida albicans* (27).....77
- Figura 7.** Exame direto de amostra clínica de secreção vaginal, realizado a fresco entre lâmina e lamínula e observado sob microscopia óptica (400 x de magnificação). A seta preta representa uma estrutura de filamentação, a seta verde representa blastoconídios em brotamento e a seta branca representa uma célula epitelial da mucosa vaginal. Fonte: Acervo pessoal.....79
- Figura 8.** Exame direto de amostra clínica de secreção anal realizado a fresco entre lâmina e lamínula e observado sob microscopia óptica (400 x de magnificação), revelando a presença de células leveduriformes (seta). Fonte: Acervo pessoal.....79

**Figura 9.** Placa de SDA com cloranfenicol e rosa de bengala inoculada com suspensão de secreção anal, após incubação de 96h a 30°C. Fonte: Acervo pessoal.....81

**Figura 10.** Número de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Candida albicans*/mL de suspensão (Log 10) das amostras clínicas (secreções vaginais e anais) obtidas de pacientes com sintomatologia compatível com CVV, determinadas após 96 h de incubação em SDA a 30 °C. Média vaginal  $\pm$  DP = 7139  $\pm$  8763; média anal  $\pm$  DP = 331  $\pm$  762.  $p < 0,0001$  (teste t de Mann-Whitney comparando-se as amostras vaginais com as amostras anais quanto ao n° de UFC).....82

**Figura 11.** Observação do número de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Candida albicans*/mL de suspensão de amostras de secreções vaginais sequenciais obtidas de pacientes com sintomatologia compatível com CVV, determinadas após 96 h de incubação em SDA a 30 °C.....83

**Figura 12.** Observação do número de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Candida albicans*/mL de suspensão de amostras de secreções anais sequenciais obtidas de pacientes com sintomatologia compatível com CVV, determinadas após 96 h de incubação em SDA a 30 °C.....84

**Figura 13.** Aderência de *Candida albicans* a CEBH após incubação de 1h, 37 °C, 200 rpm. A seta preta representa a célula epitelial bucal humana (CEBH), enquanto que as brancas, os blastoconídios aderidos à mesma. Microscopia óptica (400 x de magnificação).....85

**Figura 14.** Aderência dos isolados de *Candida albicans* inclusos no estudo às CEBH após período de incubação de 1 h a 37 C°, 200 rpm. Média total  $\pm$  DP = 194  $\pm$  95. Cada barra representa a média  $\pm$  DP da triplicata obtida para cada isolado. T = Desvio padrão.....86

**Figura 15.** Comparação da capacidade de aderência às CEBH apresentada pelos isolados de *Candida albicans* entre diferentes grupos, classificados de acordo com o período de estudo e o sítio de isolamento. Cada barra representa a média  $\pm$  DP dos resultados obtidos para todos os isolados de cada grupo. T = Desvio padrão. \* Teste de Mann-Whitney comparando-se os isolados do primeiro período de estudo com os isolados do segundo período de estudo;  $p < 0,05$ .....87

**Figura 16.** Capacidade de aderência dos pares (cepa vaginal e cepa anal) de isolados de *Candida albicans* às CEBH após período de incubação de 1 h a 37 C°, 200 rpm. Cada barra representa a média  $\pm$  DP da triplicata obtida para cada isolado. T = Desvio padrão. \* Teste t de Student comparando-se os isolados vaginais com os isolados anais correspondentes;  $p < 0,05$ .....88

**Figura 17.** Observação do comportamento da capacidade de aderência às CEBH em isolados vaginais sequenciais de *Candida albicans* após período de incubação de 1 h a 37 C°, 200 rpm. Cada barra representa a média  $\pm$  DP da

triplicata obtida para cada isolado. T = Desvio padrão. \* Teste t de Student comparando-se os isolados vaginais de cada paciente entre si;  $p < 0,05$ .....89

**Figura 18.** Observação do comportamento da capacidade de aderência às CEBH em isolados anais sequenciais de *Candida albicans* após período de incubação de 1 h a 37 C°, 200 rpm. Cada barra representa a média  $\pm$  DP da triplicata obtida para cada isolado. T = Desvio padrão. \* Teste t de Student comparando-se os isolados anais de cada paciente entre si;  $p < 0,05$ .....89

**Figura 19.** Atividade de proteinase dos isolados de *Candida albicans* inclusos no estudo após período de incubação em BSA por 1 h, pH 3,8, a 37 C°. Média total  $\pm$  DP =  $0,044 \pm 0,015$ . Cada barra representa a média  $\pm$  DP da triplicata obtida para cada isolado. T = Desvio padrão. As barras vermelhas correspondem a isolados com atividade de proteinase abaixo do ponto de corte.....90

**Figura 20.** Comparação da atividade de proteinase apresentada pelos isolados de *Candida albicans* entre diferentes grupos, classificados de acordo com o período de estudo e o sítio de isolamento. Cada barra representa a média  $\pm$  DP dos resultados obtidos para todos os isolados de cada grupo. T = Desvio padrão.....91

**Figura 21.** Atividade de proteinase dos pares (cepa vaginal e cepa anal) de isolados de *Candida albicans* após período de incubação em BSA por 1 h, pH 3,8, a 37 C°. Cada barra representa a média  $\pm$  DP da triplicata obtida para cada isolado. T = Desvio padrão. \* Teste t de Student comparando-se os isolados vaginais com os isolados anais correspondentes;  $p < 0,05$ .....92

**Figura 22.** Observação do comportamento da atividade de proteinase em isolados vaginais sequenciais de *Candida albicans* após período de incubação em BSA por 1 h, pH 3,8, a 37 C°. Cada barra representa a média  $\pm$  DP da triplicata obtida para cada isolado. T = Desvio padrão. \* Teste t de Student comparando-se os isolados vaginais de cada paciente entre si;  $p < 0,05$ .....93

**Figura 23.** Observação do comportamento da atividade de proteinase em isolados anais sequenciais de *Candida albicans* após período de incubação em BSA por 1 h, pH 3,8, a 37 C°. Cada barra representa a média  $\pm$  DP da triplicata obtida para cada isolado. T = Desvio padrão. \* Teste t de Student comparando-se os isolados anais de cada paciente entre si;  $p < 0,05$ .....93

**Figura 24.** Morfogênese (transição levedura-hifa) de *Candida albicans* após incubação de 3h, 37 °C, 200 rpm. Seta preta = célula de levedura com IM 1; seta verde = célula com IM 2; seta branca = célula (tubo germinativo) com IM 4. Microscopia óptica (400 X de magnificação).....94

**Figura 25.** Porcentagem de formação de tubo germinativo dos isolados de *Candida albicans* inclusos no estudo após período de incubação em soro fetal bovino a 20% em YPD por 1 h, a 37 C°, 200 rpm. Média total  $\pm$  DP =  $42,1 \pm 20,2$ . Cada barra representa o valor obtido para cada isolado.....95

**Figura 26.** Índice morfológico (IM) dos isolados de *Candida albicans* inclusos no estudo após período de incubação em soro fetal bovino a 20% em YPD por 3 h, a 37 C°, 200 rpm. Média total  $\pm$  DP = 3,05  $\pm$  0,53. Cada barra representa o valor obtido para cada isolado.....96

**Figura 27.** Comparação da porcentagem de formação de tubo germinativo após 1h de incubação apresentada pelos isolados de *Candida albicans* entre diferentes grupos, classificados de acordo com o período de estudo e o sítio de isolamento. Cada barra representa a média  $\pm$  DP dos resultados obtidos para todos os isolados de cada grupo. T = Desvio padrão. \* Teste de Mann-Whitney comparando-se os isolados do primeiro período de estudo com os isolados do segundo período de estudo;  $p < 0,05$ .....97

**Figura 28.** Comparação do índice morfológico (IM) após 3h de incubação apresentada pelos isolados de *Candida albicans* entre diferentes grupos, classificados de acordo com o período de estudo e o sítio de isolamento. Cada barra representa a média  $\pm$  DP dos resultados obtidos para todos os isolados de cada grupo. T = Desvio padrão. \* Teste de Mann-Whitney comparando-se os isolados do primeiro período de estudo com os isolados do segundo período de estudo;  $p < 0,05$ .....97

**Figura 29.** Porcentagem de formação de tubo germinativo dos pares (cepa vaginal e cepa anal) de isolados de *Candida albicans* após período de incubação em soro fetal bovino a 20% em YPD por 1 h, a 37 C°, 200 rpm. Cada barra representa o valor obtido para cada isolado.....98

**Figura 30.** Índice morfológico dos pares (cepa vaginal e cepa anal) de isolados de *Candida albicans* após período de incubação em soro fetal bovino a 20% em YPD por 3 h, a 37 C°, 200 rpm. Cada barra representa o valor obtido para cada isolado.....98

**Figura 31.** Observação do comportamento da porcentagem de formação de tubo germinativo em isolados vaginais sequenciais de *Candida albicans* após período de incubação em soro fetal bovino a 20% em YPD por 1 h, a 37 C°, 200 rpm. Cada barra representa o valor obtido para cada isolado.....99

**Figura 32.** Observação do comportamento do índice morfológico (IM) em isolados vaginais sequenciais de *Candida albicans* após período de incubação em soro fetal bovino a 20% em YPD por 3 h, a 37 C°, 200 rpm. Cada barra representa o valor obtido para cada isolado.....100

**Figura 33.** Observação do comportamento da porcentagem de formação de tubo germinativo em isolados anais sequenciais de *Candida albicans* após período de incubação em soro fetal bovino a 20% em YPD por 1 h, a 37 C°, 200 rpm. Cada barra representa o valor obtido para cada isolado.....101

**Figura 34.** Observação do comportamento do índice morfológico (IM) em isolados anais sequenciais de *Candida albicans* após período de incubação em soro fetal bovino a 20% em YPD por 3 h, a 37 C°, 200 rpm. Cada barra representa o valor obtido para cada isolado.....101

**Figura 35.** Formação de biofilme dos isolados de *Candida albicans* inclusos no estudo após período de incubação em YNB por 66 h, a 37 C°, 75 rpm. Média total  $\pm$  DP = 0,252  $\pm$  0,337. Cada barra representa a média  $\pm$  DP da triplicata obtida para cada isolado. T = Desvio padrão.....102

**Figura 36.** Comparação da capacidade de formação de biofilme apresentada pelos isolados de *Candida albicans* entre diferentes grupos, classificados de acordo com o período de estudo e o sítio de isolamento. Cada barra representa a média  $\pm$  DP dos resultados obtidos para todos os isolados de cada grupo. T = Desvio padrão. \* Teste de Mann-Whitney comparando-se os isolados do primeiro período de estudo com os isolados do segundo período de estudo;  $p < 0,05$ .....103

**Figura 37.** Formação de biofilme dos pares (cepa vaginal e cepa anal) de isolados de *Candida albicans* após período de incubação em YNB por 66 h, a 37 C°, 75 rpm. Cada barra representa a média  $\pm$  DP da triplicata obtida para cada isolado. T = Desvio padrão. \* Teste t de Student comparando-se os isolados vaginais com os isolados anais correspondentes;  $p < 0,05$ .....104

**Figura 38.** Observação do comportamento da capacidade formação de biofilme em isolados vaginais sequenciais de *Candida albicans* após período de incubação em YNB por 66 h, a 37 C°, 75 rpm. Cada barra representa a média  $\pm$  DP da triplicata obtida para cada isolado. T = Desvio padrão. \* Teste t de Student comparando-se os isolados vaginais de cada paciente entre si;  $p < 0,05$ .....105

**Figura 39.** Observação do comportamento da capacidade de formação de biofilme em isolados vaginais sequenciais de *Candida albicans* após período de incubação em YNB por 66 h, a 37 C°, 75 rpm. Cada barra representa a média  $\pm$  DP da triplicata obtida para cada isolado. T = Desvio padrão. \* Teste t de Student comparando-se os isolados vaginais de cada paciente entre si;  $p < 0,05$ .....106

**Figura 40.** Correlação entre atividade de proteinase e os demais fatores de virulência: (A) capacidade de aderência às CEBH; (B) formação de biofilme; (C) porcentagem de formação de tubo germinativo após 1h de incubação; (D) índice morfológico após 3h de incubação.  $r$  = Coeficiente de correlação de Spearman.....108

**Figura 41.** (A) Correlação entre capacidade de aderência às CEBH e porcentagem de formação de tubo germinativo após 1h de incubação; (B) correlação entre capacidade de aderência às CEBH e índice morfológico após 3h de incubação; (C) correlação entre capacidade de formação de biofilme e porcentagem de formação de tubo germinativo após 1h de incubação; (D) correlação entre capacidade de formação de biofilme e índice morfológico após 3h de incubação; (E) correlação entre capacidade de formação de biofilme e capacidade de aderência às CEBH; (F) correlação entre índice morfológico (IM) após 3h de incubação e porcentagem de formação de tubo germinativo após 1h de incubação.  $r$  = Coeficiente de correlação de Spearman.....109

**Figura 42.** Genotipagem ABC dos isolados clínicos de *Candida albicans* incluídos no estudo. PM = Marcador de peso molecular; pb = pares de base. Os números correspondem ao número de registro no banco de micro-organismos do LMMM.....114

**Figura 43.** Genotipagem por microssatélite dos isolados clínicos de *Candida albicans* incluídos no estudo. PM = Marcador de peso molecular; pb = pares de base. Os números correspondem ao número de registro no banco de micro-organismos do LMMM.....119

**Figura 44.** Genotipagem por RAPD dos isolados clínicos de *Candida albicans* incluídos no estudo. PM = Marcador de peso molecular; pb = pares de base. Os números correspondem ao número de registro no banco de micro-organismos do LMMM.....122

**Figura 45.** Dendrograma gerado pelo programa GelComparII pelo método UPGMA referente aos padrões de bandas gerados por amplificação utilizando o “primer” M13. As cores representam os diferentes “clusters”. “Cluster” 1 (vermelho); “cluster” 2 (verde); “cluster” 3 (azul). As cepas destacadas correspondem às cepas de referência SC 5314 e ATCC 90028.....125

**Figura 46.** Dendrograma gerado pelo programa GelComparII pelo método UPGMA referente aos padrões de bandas gerados por amplificação utilizando o “primer” B14. As cores representam os diferentes “clusters”. “Cluster” 1 (laranja); “cluster” 2 (roxo); “cluster” 3 (verde); “cluster” 4 (vermelho); “cluster” 5 (azul); “cluster” 6 (rosa). As cepas destacadas correspondem às cepas de referência SC 5314 e ATCC 90028.....126

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Isolados de *Candida albicans* obtidos no primeiro período de estudo, de maio de 2003 a maio de 2005, obtidos de pacientes com manifestação clínica compatível com CVV.....72
- Tabela 2** – Isolados de *Candida albicans* obtidos no segundo período de estudo, de novembro de 2011 a agosto de 2012, obtidos de pacientes com manifestação clínica compatível com CVV.....73
- Tabela 3** – Sinais e sintomas de CVV apresentados pelas pacientes incluídas no presente estudo.....74
- Tabela 4** – Fatores predisponentes de CVV apresentados pelas pacientes incluídas no presente estudo.....76
- Tabela 5** – Uso de antifúngico pelas pacientes incluídas no estudo com manifestação clínica compatível com CVV.....78
- Tabela 6** – Estruturas evidenciadas ao exame direto das amostras clínicas (secreção vaginal e secreção anal) coletadas entre novembro de 2011 e agosto de 2012.....80
- Tabela 7** – Correlação entre os fatores de virulência avaliados no estudo.....108
- Tabela 8** – Comparação entre os valores dos fatores de virulência dos isolados clínicos vaginais na presença de diferentes condições clínicas de CVV.....110
- Tabela 9** – Comparação entre os valores dos fatores de virulência dos isolados clínicos vaginais na presença de diferentes situações predisponentes à CVV.....111
- Tabela 10** – Comparação entre os valores dos fatores de virulência dos isolados clínicos vaginais na ausência ou presença de antifúngico.....112
- Tabela 11** – Distribuição dos isolados clínicos de *Candida albicans* do presente estudo quanto ao genótipo ABC encontrado.....113
- Tabela 12** – Distribuição dos isolados pares (cepa vaginal e cepa anal) de *Candida albicans* quanto ao grau de relacionamento genético.....117
- Tabela 13** – Distribuição dos isolados sequenciais vaginais e anais de *Candida albicans* quanto ao grau de alteração genética ao longo do tempo.....118
- Tabela 14** – Comparação entre os valores dos fatores de virulência apresentados pelos isolados de *Candida albicans* dos diferentes genótipos ABC obtidos no segundo período de estudo (novembro de 2011 a agosto de 2012).....127

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

**AIDS:** Síndrome da Imunodeficiência Adquirida  
**Als:** *Agglutinin-like sequence*  
**ATCC:** *American Type Culture Collection*  
**BSA:** *Bovine Serum Albumine*  
**C.:** *Candida*  
**CARE-2:** *Candida albicans repetitive element-2*  
**CBS:** *Centraalbureau voor Schimmel-culture*  
**CDC:** *Center for Disease Control*  
**CD4:** *Cluster Differentiation 4*  
**CO<sub>2</sub>:** Gás carbônico  
**Cph:** *Candida pseudohyphal regulator*  
**CVV:** Candidíase Vulvovaginal  
**CVVR:** CVV recorrente  
**°C:** Grau celsius  
**DIU:** Dispositivo intrauterino  
**DNA:** Ácido desoxirribonucléico  
**dATP:** Desoxiadenosina trifosfato  
**dCTP:** Desoxicitosina trifosfato  
**dGTP:** Desoxiguanina trifosfato  
**dTTP:** Desoxitimidina trifosfato  
**DO:** Densidade óptica  
**DST:** Doença Sexualmente Transmissível  
**EDTA:** Ácido etileno diaminotetracético  
**Efg:** *Enhanced filamentous growth*  
**et al.:** Colaboradores  
**g/L:** Grama por litro  
**HIV:** Vírus da Imunodeficiência Humana  
**h:** Hora  
**Hwp:** *Hyphal wall protein*  
**Hyr:** *Hyphally regulated protein*  
**IM:** Índice Morfológico  
**ITS:** *Internal Transcript Spacer*  
**Kb:** Kilobase  
**KCl:** Cloreto de Sódio  
**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:** Fosfato de potássio monobásico  
**LIAC:** Laboratório Integrado de Análises Clínicas  
**M:** Molar  
**MEJC:** Maternidade Escola Januário Cicco  
**min:** Minuto  
**mL:** mililitro  
**mL/L:** mililitro por litro  
**MLST:** *Multilocus Sequence Typing*  
**mM:** Milimolar  
**mm:** Milímetro  
**MgCl<sub>2</sub>:** Cloreto de magnésio  
**mg/mL:** Miligrama por mililitro

**µg/mL:** Micrograma por mililitro  
**µL:** microlitro  
**µM:** micromolar  
**Nº:** número  
**NaCl:** Cloreto de sódio  
**Na<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub>:** Fosfato de sódio dibásico  
**NGY:** *Neopeptone – yeast extract - glucose*  
**ng/µL:** nanograma por microlitro  
**nm:** nanômetro  
**PAMPs:** Padrões moleculares associados a patógenos  
**PBS:** *Phosphate Buffered Saline*  
**PCR:** *Polymerase Chain Reaction*  
**pH:** Potencial hidrogeniônico  
**PMNs:** Polimorfonucleares  
**pmol/µL:** Picomol por microlitro  
**®:** marca registrada  
**RAPD:** *Randomly Amplified Polymorphic DNA*  
**rDNA:** DNA codificador do RNA ribossomal  
**RFPL:** *Restriction Fragment Length Polymorphism*  
**RNA:** Ácido ribonucléico  
**rRNA:** RNA ribossomal  
**ROS:** Espécies reativas de oxigênio  
**Rpm:** Rotações por minuto  
**Sap:** Proteinase aspártica secretada  
**SDA:** Sabouraud Dextrose Agar  
**spp.:** Espécies  
**SSCP:** *Single-strand conformation polymorphism*  
**TAE:** Tris acetato EDTA  
**™:** *Trade Mark*  
**UFC:** Unidade formadora de colônia  
**UFRN:** Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
**U/mL:** Unidade por mililitro  
**UV:** Ultravioleta  
**YPD:** *Yeast Peptone Dextrose*  
**YCB:** *Yeast Carbon Base*  
**YNB:** *Yeast Nitrogen Base*

## RESUMO

**Introdução:** Candidíase vulvovaginal (CVV) é uma das causas mais comuns de vaginite e acomete cerca de 75% das mulheres em idade reprodutiva, sendo a maioria dos casos (80 a 90%) devido à *C. albicans*, espécie mais virulenta do gênero. Atributos de virulência em CVV são pouco investigados, bem como a fonte da infecção permanece incerta. **Objetivo:** Este trabalho teve por finalidade avaliar os fatores de virulência e genótipos de isolados clínicos de *C. albicans* sequencialmente obtidos do ânus e da vagina de pacientes com CVV esporádica e recorrente. **Material e métodos:** Foram analisados 62 isolados clínicos de *C. albicans* (36 isolados vaginais e 26 isolados anais). Realizou-se o exame direto das amostras de secreção vaginal e anal e contagem de unidades formadoras de colônia (UFC); as leveduras foram identificadas por meio cromogênico CHROMagar Candida® e por metodologia clássica e caracterizadas fenotipicamente quanto a fatores de virulência, incluindo a capacidade de aderência a CEBH, a atividade de proteinase, a morfogênese e a formação de biofilme. Para a avaliação da variabilidade genotípica, empregou-se a técnica de genotipagem ABC, além da genotipagem por microsatélites e RAPD. **Resultados:** Verificou-se 100% de concordância entre o exame direto e a cultura de amostras vaginais, observando-se a presença de formas filamentosas na maioria das amostras de secreção vaginal, as quais apresentaram contagem de UFC significativamente superior àquela apresentada pelas amostras de secreção anal. Não se observou diferença estatisticamente significativa quando se comparou os fatores de virulência dos isolados vaginais infectantes com aqueles apresentados pelos isolados anais colonizantes; bem como comparando-se os isolados vaginais de *C. albicans* obtidos de grupos de pacientes com diferentes condições clínicas (CVV esporádica e com CVVR). Observa-se uma tendência à diminuição da capacidade de aderência, morfogênese e formação de biofilme do isolado vaginal infectante ao longo do tempo e sugere-se associação entre a capacidade de expressar os diferentes fatores de virulência estudados e as manifestações clínicas apresentadas pelas pacientes. O genótipo A foi o mais prevalente (93,6%), seguido do genótipo C (6,4%). Houve manutenção do mesmo genótipo ABC e maior prevalência de microevolução das cepas vaginais de *C. albicans* obtidas sequencialmente, bem como se observou o mesmo genótipo ABC e alta similaridade genética entre isolados vaginais e anais de *C. albicans* obtidos simultaneamente da mesma paciente. **Conclusão:** Ressalta-se que a proliferação da levedura e a transição levedura-hifa são importantes no estabelecimento da CVV. A expressão dos fatores de virulência é importante na patogênese de CVV, contudo não parece ser determinante na transição de colonização para infecção nem na instalação de quadro recorrente de CVV. O genótipo A demonstra ser dominante em relação aos demais tanto em isolados vaginais quanto em isolados anais de pacientes com CVV. Verifica-se a ocorrência de microevolução das cepas de *C. albicans* no ambiente vaginal como cenário mais comum. Sugere-se que o reservatório anal constituiu uma possível fonte da infecção vaginal, na grande maioria dos casos avaliados.

**Palavras-chave:** Candidíase vulvovaginal, *Candida albicans*, Fatores de virulência, Genotipagem.

## ABSTRACT

**Introduction:** Vulvovaginal candidiasis (VVC) is one of the most common causes of vaginitis and affects about 75% of women of reproductive age. The majority of cases (80 to 90%) are due to *C. albicans*, the most virulent species of the genus *Candida*. Virulence attributes are scarcely investigated and the source of infection remains uncertain. **Objective:** This study aimed to evaluate the virulence factors and genotypes of clinical isolates of *C. albicans* sequentially obtained from the anus and vagina of patients with sporadic and recurrent VVC. **Materials and methods:** We analyzed 62 clinical isolates of *C. albicans* (36 vaginal and 26 anal strains). Direct examination of vaginal and anal samples and colony forming units (CFU) counts were performed. Yeasts were identified using the chromogenic media CHROMagar Candida<sup>®</sup> and by classical methodology, and phenotypically characterized regarding to virulence factors, including the ability to adhere to epithelial cells, proteinase activity, morphogenesis and biofilm formation. The genotypes of the strains were investigated with ABC genotyping, microsatellite genotyping with primer M13 and RAPD. **Results:** We found 100% agreement between direct examination and culture of vaginal samples. Filamentous forms were present in most of the samples of vaginal secretion, which presented CFU counts significantly higher than the samples of anal secretion. There was no statistically significant difference between virulence factors of infecting vaginal isolates and those presented by colonizing anal isolates; as well as for the comparison of the vaginal isolates from patients with different clinical conditions (sporadic or recurrent VVC). There was a decrease in the ability to adhere to HBEC, morphogenesis and biofilm formation of the vaginal isolates during the progress of infection. There was an association between the ability to express different virulence factors and the clinical manifestations presented by the patients. Genotype A was the most prevalent (93.6%), followed by genotype C (6.4%). We found maintenance of the same ABC genotype and greater prevalence of microevolution for the vaginal strains of *C. albicans* sequentially obtained. Vaginal and anal isolates of *C. albicans* obtained simultaneously from the same patient presented the same ABC genotype and high genetic relatedness. **Conclusion:** It is noteworthy that the proliferation of yeast and bud-to-hypha transition are important for the establishment of CVV. The expression of virulence factors is important for the pathogenesis of VVC, although it does not seem to be determinant in the transition from colonization to infection or to the installation of recurrent condition. Genotype A seems to be dominant over the others in both vaginal and anal isolates of patients with VVC. The most common scenario was microevolution of the strains of *C. albicans* in the vaginal environment. It is suggested that the anal reservoir constituted a possible source of vaginal infection, in most cases assessed.

**Key words:** Vulvovaginal candidiasis, *Candida albicans*, Virulence factors, Genotyping.

## 1 INTRODUÇÃO

*Candida albicans* é uma levedura capaz de sobreviver como comensal em superfícies mucosas como trato gastrointestinal, oral e vaginal em indivíduos saudáveis. Frequentemente causa infecções superficiais de pele e mucosas, sendo que no ambiente hospitalar é responsável por uma alta prevalência de infecções invasivas. Entre os fatores de risco para as infecções por este agente, encontram-se o uso de antibióticos, terapia imunossupressora, nutrição parenteral e procedimentos médicos invasivos. Neste contexto, considera-se *Candida* como patógeno oportunista (MAVOR, THEWES, HUBE, 2005; ODDS, 1994a).

Do ponto de vista clínico, *C. albicans* é a principal espécie do gênero associada à maioria das manifestações patológicas causadas por estas leveduras (MORAN, SULLIVAN, COLEMAN, 2002), figurando como a mais virulenta espécie do gênero *Candida*, tanto em modelos de infecção experimental, quanto causando infecção em humanos, fator este que pode ser justificado pela presença de um conjunto de atributos de virulência que contribuem para a sua patogenicidade (MAVOR, THEWES, HUBE, 2005; ODDS, 1994a).

Dentre estes fatores de virulência, aqueles universalmente reconhecidos são a capacidade de aderir a células epiteliais e endoteliais humanas, a transição levedura-hifa (morfogênese), a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares, como as proteinases e fosfolipases, a variabilidade fenotípica ("phenotypic switching") e a capacidade de aderir e secretar uma matriz exopolimérica em materiais implantados, bem como nos tecidos de pacientes, originando uma estrutura denominada de biofilme (CALDERONE, FONZI, 2001; HASAN et al., 2009). Estes atributos são essenciais na colonização de tecidos do hospedeiro, bem como no estabelecimento da infecção, uma vez que permitem a adesão, penetração e dano tecidual, a aquisição de nutrientes, além de auxiliarem na evasão do sistema imunológico do hospedeiro (ODDS, 1994b; RAMAGE et al., 2001).

Candidíase vulvovaginal (CVV) é uma infecção da vulva e da vagina, causada pelas várias espécies de *Candida*, sendo *Candida albicans* a espécie

mais prevalente em CVV, respondendo por 80 a 90% dos casos (DAN, POCH, LEVIN, 2002; FERRAZZA et al., 2005; FIDEL, 2002; SOBEL, 1992).

Aproximadamente 75% das mulheres em idade reprodutiva são afetadas por CVV (SOBEL, 1988), das quais 5% desenvolvem candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR), definida pela ocorrência de três ou mais episódios de CVV ao ano (FIDEL, SOBEL, 1996; MARDH et al., 2002).

Mesmo com os avanços terapêuticos, atualmente a CVV vem sendo considerada um importante problema de saúde pública mundial, acometendo milhões de mulheres de todas as camadas sociais, causando grande desconforto e prejudicando as relações sexuais e afetivas, além de comprometer o desempenho laboral (KENT, 1991; SOBEL, 1985).

Apesar da relevância do tema, o número de informações na literatura sobre o assunto é ainda insatisfatório, bem como as autoridades sanitárias e agências de apoio à pesquisa não têm dado a devida atenção ao problema, embora diversos dados epidemiológicos e microbiológicos permaneçam controversos (HOLANDA et al., 2007).

Os fatores predisponentes do hospedeiro que contribuem para a ocorrência de CVV encontram-se bem definidos e caracterizados (ÁLVARES, SVIDZINSKI, CONSOLARO, 2007). Contudo, sabe-se que a levedura não é apenas um participante passivo no processo infeccioso, uma vez que pequenas alterações no hospedeiro são suficientes para desencadear a doença, ressaltando-se o potencial patogênico de espécies de *Candida*, atribuído a um extenso repertório de fatores de virulência seletivamente expressos sob condições adequadas (SWEET, 1997). Vários atributos de virulência são propostos em CVV, porém os mesmos foram pouco investigados (ÁLVARES, SVIDZINSKI, CONSOLARO, 2007).

Torna-se necessário distinguir os fatores de virulência que estão diretamente ligados à invasão do hospedeiro daqueles responsáveis pela manutenção celular do micro-organismo como comensal, uma vez que a primeira barreira encontrada pela levedura trata-se de sobreviver em diferentes nichos do hospedeiro. Além deste aspecto, existem poucos dados na literatura, principalmente referentes ao Nordeste brasileiro, analisando diferenças na expressão dos diferentes fatores de virulência de cepas isoladas de pacientes com CVV colhidas dentro de um cenário clínico específico.

Estudos indicam a existência de cepas de *C. albicans* com tropismo para a vagina, uma vez que os genótipos de isolados clínicos de *C. albicans* predominantemente encontrados em pacientes com CVV raramente estão presentes em outros sítios corporais (FAN et al., 2008; LI, BAI, 2007).

Também tem sido determinado que há uma correlação entre genótipos de cepas de *C. albicans* com a gravidade da CVV e, possivelmente, com a ocorrência de CVV recorrente (CVVR). Certamente, a identificação de genótipos específicos de *C. albicans* relacionados à gravidade da CVV é de grande importância para o diagnóstico e tratamento desta enfermidade (FAN et al., 2008).

Vários estudos têm sido realizados sobre a epidemiologia da CVV, contudo a fonte da infecção permanece incerta, havendo duas hipóteses principais para a causa de CVVR: reinfecção a partir de reservatórios em sítios extragenitais, como o trato gastrointestinal, ou através da transmissão sexual (LI et al., 2008; MARDH, NOVIKOVA, STUKALOVA, 2003; MILES, OLSEN, ROGERS, 1977; SCHROPPEL et al., 1994) e recidiva como resultado da erradicação incompleta da cepa de *Candida* da vagina (SOBEL, 1985). Dessa maneira, mais estudos se fazem necessários para a elucidação da fonte de infecção em mulheres com CVVR.

Em estudo recente realizado no Rio Grande do Norte (HOLANDA et al., 2007), observou-se que pacientes colonizadas na região anal por *C. albicans* apresentaram cerca de 5 vezes mais chance de desenvolver CVV. De fato, a transmissão endógena através do trato gastrointestinal consiste na principal fonte de leveduras vaginais (FIDEL, SOBEL, 1996). Sendo assim, torna-se necessário entender os fatores do patógeno cruciais no processo de transição de colonização para infecção, durante o estabelecimento da CVV.

O presente trabalho tem como objetivo caracterizar genotipicamente e fenotipicamente isolados clínicos de *C. albicans* sequencialmente obtidos de ânus e vagina de pacientes com CVV, incluindo a avaliação da expressão dos fatores de virulência (capacidade de aderir a células epiteliais humanas, produção de proteinases, transição levedura-hifa e formação de biofilme) desta levedura patogênica. Além disso, almeja-se traçar possíveis correlações destes fatores com a sintomatologia, os fatores de risco e o uso de antifúngicos, através dos dados clínicos obtidos das pacientes, bem como relacionar

geneticamente os isolados obtidos. Espera-se encontrar divergências na capacidade adaptativa de expressar os diversos fatores de virulência nas diferentes situações observadas.

Assim, busca-se compreender os mecanismos relacionados aos fatores predisponentes do hospedeiro e aos atributos de virulência do patógeno que contribuem para o estabelecimento da infecção, auxiliando no descobrimento de novas medidas de prevenção e de alvos terapêuticos para o desenvolvimento de novos fármacos efetivos no tratamento da candidíase vulvovaginal, o que é de grande importância, uma vez que *C. albicans*, bem como as demais espécies de *Candida* tornam-se frequentemente resistentes à ação de antifúngicos, sendo necessário o investimento na busca de modelos alternativos de tratamento.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 *Candida albicans*, PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA

*C. albicans* coloniza a cavidade oral de até 75% da população saudável, podendo encontrar-se também como comensal da pele, da mucosa genital e/ou do trato gastrointestinal de seres humanos, sendo notável que, em circunstâncias normais, esta levedura não causa doenças importantes (MAVOR, THEWES, HUBE, 2005; ODDS, 1994a).

Quando há ruptura do equilíbrio, local ou imunológico, leveduras do gênero *Candida* passam do estado sapróbio ao patogênico, podendo formar pseudo-hifas e hifas verdadeiras, invadir tecidos e provocar candidíase, ocasionando sintomas indesejáveis (FIDEL, GOW, 2002).

Dentre as espécies deste gênero, *C. albicans* figura como a mais virulenta, tanto em modelos de infecção experimental, quanto causando doença em humanos, fator este que pode ser justificado pela presença de um conjunto de atributos de virulência que contribuem para a sua patogenicidade (MAVOR, THEWES, HUBE, 2005; ODDS, 1994a).

A patogenicidade de um micro-organismo é definida como sua capacidade de determinar doença, que é mediada por múltiplos fatores. A transição de um micro-organismo comensal inofensivo a patógeno é atribuível a um extenso repertório de fatores de virulência seletivamente expressos sob adequadas condições predisponentes (NAGLIK, CHALLACOMBE, HUBE, 2003).

Apesar de certos aspectos da virulência serem determinados geneticamente, eles são expressos pelos micro-organismos apenas quando existem condições ambientais favoráveis, tais como teor nutricional, atmosfera de oxigênio e temperatura. Essas condições são específicas para cada micro-organismo e para cada isolado de determinado agente. Podem variar de hospedeiro para hospedeiro, conforme o tipo de infecção (mucosas ou sistêmicas), o sítio e estágio da infecção, bem como a natureza da resposta de cada indivíduo. Assim, a maioria dos patógenos, incluindo *C. albicans*, tem desenvolvido uma bateria eficaz de fatores de virulência e estratégias específicas para ajudar na sua capacidade de colonizar tecidos do hospedeiro

e vencer as barreiras dos mesmos, causando a doença. Estes fatores atuam em conjunto, porém nem todos podem ser necessários para uma determinada fase da infecção (CUTLER, 1991; MAYER, WILSON, HUBE, 2013; ODDS, 1994b).

Dentre os atributos de virulência de *C. albicans*, a adesão às células do hospedeiro, a morfogênese e a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares constituem requisitos básicos para o estabelecimento de infecção (ODDS, 1994a).

A formação de biofilme está associada a diversas manifestações infecciosas causadas por *C. albicans* (RAMAGE et al., 2001) e sugere-se que a capacidade de formar esta complexa comunidade microbiana, fortemente aderida em um dispositivo médico implantado, ou mesmo ao tecido de um hospedeiro, pode contribuir para a virulência desta levedura (TUMBARELLO et al., 2007).

### **2.1.1 Capacidade de aderência como fator de virulência em *C. albicans***

O processo de patogênese de *C. albicans* segue três etapas, sendo a primeira a adesão às células epiteliais do hospedeiro, evento inicial importante para o estabelecimento da doença e essencial para a manutenção do micro-organismo no hospedeiro humano (ODDS, 1994a).

A capacidade de adesão de *C. albicans* é maior que das outras espécies do gênero *Candida* (KING, LEE, MORRIS, 1980), o que poderia explicar, pelo menos em parte, a maior prevalência da mesma nas mais variadas formas de infecção. Esta se utiliza de adesinas, geralmente polissacarídeos ou, mais comumente, glicoproteínas, para aderir a receptores de membrana em células epiteliais humanas ou a componentes da matriz extracelular (CALDERONE, GOW, 2002), como fibronectina (KLOTZ, 1990).

Algumas destas proteínas reconhecidamente responsáveis pela adesão são as aglutininas, glicoproteínas de superfície celular. A família *ALS* (“agglutinin-like sequence”) de *C. albicans* inclui oito genes (HOYER et al., 2008). Cada gene *ALS* tem em comum três domínios na estrutura: o domínio 5’ que é 55-90% idêntico em toda a família, um domínio central com número variável de repetições em tandem de 108 pb e o domínio 3’ que é relativamente

variável no tamanho e na sequência em toda a família (HOYER, 2001). A expressão destes genes é regulada diferencialmente em *C. albicans*, dependendo das condições fisiológicas, como mudanças no meio de crescimento (HOYER et al., 1995), morfologia (HOYER, HECHT, 2000) e estágio de crescimento (HOYER, PAYNE, HECHT, 1998).

O estudo de Lehrer et al. (1986), utilizando uma cepa mutante com menor capacidade de aderência a células da mucosa vaginal, sugere que este atributo de virulência pode ser um fator determinante na patogênese da infecção vaginal causada por *C. albicans*, uma vez que a cepa mutante apresentou uma taxa de infecção em modelo animal de apenas 31% em relação à taxa obtida para a cepa selvagem.

A capacidade de aderência em *C. albicans* também pode se estender a dispositivos médicos, tais como: cateteres, próteses dentárias, tubos traqueais, entre outros, podendo, conseqüentemente, originar uma estrutura complexa formada por micro-organismos sésseis embebidos em uma matriz exopolimérica, denominada de biofilme (NOBILE et al., 2006b).

### **2.1.2 Atividade de proteinase como fator de virulência em *C. albicans***

As proteinases extracelulares de fungos sapróbios são secretadas essencialmente com o objetivo de digerir moléculas proteicas, para aquisição de nutrientes para as células microbianas (NAGLIK, CHALLACOMBE, HUBE, 2003). Contudo, os fungos patogênicos tem adaptado esta propriedade bioquímica, utilizando-a durante o processo infeccioso na execução de diversas funções especializadas, tais como a hidrólise de proteínas de membranas celulares do hospedeiro, facilitando a adesão e invasão tecidual (CHOI et al., 1993; MURPHY, WALTON, 1996; SMITHSON et al., 1995), bem como o dano a células e moléculas do sistema imune com o intuito de evasão da resposta imunológica do hospedeiro (SALYERS, WITT, 1994).

Exemplos de proteínas do hospedeiro degradadas pelas proteinases são: queratina, colágeno, laminina, fibronectina, mucina, lactoferrina e enzimas do “burst” oxidativo no momento da infecção (HUBE, NAGLIK, 2001; MONOD, BORG-VON, 2002; ODDS, 2008). Assim, as proteinases apresentam amplas

funções, tendo papel fundamental tanto na manutenção do micro-organismo sapróbio quanto no desencadeamento da infecção (NAGLIK et al., 2004).

Em *C. albicans*, a atividade proteolítica é atribuída a uma família multigênica de aspartil proteinases com pelo menos nove membros, denominados *SAP1-SAP9* (DE BERNARDIS, SULLIVAN, CASSONE, 2001).

Dentre as enzimas hidrolíticas extracelulares produzidas por *C. albicans*, as três mais significantes são as proteinases aspárticas secretadas (Saps), as fosfolipases e as lipases (NAGLIK, CHALLACOMBE, HUBE, 2003). Destas, as Saps têm sido as mais estudadas como determinantes de virulência em *C. albicans* (NAGLIK, CHALLACOMBE, HUBE, 2003), que não é a única espécie de *Candida* que produz proteinases extracelulares, sabendo-se que *C. dubliniensis* (GILFILLAN et al., 1998), *C. tropicalis* (MONOD et al., 1994; TOGNI et al., 1991; ZAUGG et al., 2001) e *C. parapsilosis* (DE VIRAGH et al., 1993; MONOD et al., 1994) também produzem estas enzimas ativas *in vitro*.

As proteinases aspárticas são ubíquas na natureza e alguns exemplos bem conhecidos são as proteinases do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), a pepsina e a renina em humanos. Todas as proteinases secretadas por *C. albicans* pertencem à mesma classe (proteinases aspárticas), não tendo sido identificadas em espécies patogênicas de *Candida* proteinases das classes serina, cisteína e metalo proteinases (NAGLIK et al., 2004). As Saps apresentam sequências conservadas comuns, incluindo dois resíduos de aspartato no sítio ativo, além de resíduos de cisteína implicados na manutenção da estrutura tridimensional (HUBE, NAKLIK, 2001).

A máxima eficiência na atividade das Saps produzidas por *C. albicans* ocorre entre o pH 2 e pH 7, dependendo da isoenzima de Sap envolvida, o que, aliado às diferentes especificidades de substratos apresentadas pelas diferentes isoenzimas, permite a colonização e infecção de múltiplos sítios do hospedeiro com valores de pH e perfil de proteínas distintos (NAGLIK et al., 2004).

Estas enzimas são essenciais para o crescimento de *C. albicans* quando a proteína é a única fonte de nitrogênio (HUBE et al., 1994; HUBE et al., 1997), sendo a Sap2 a isoenzima secretada em maior quantidade nestas condições, *in vitro* (HUBE et al., 1994; WHITE, AGABIAN, 1995). A secreção da enzima é pequena quando o meio de cultura contém simples fontes de nitrogênio

(aminoácidos ou sais de amônio), mas é elevada quando possui, como única fonte de nitrogênio, a hemoglobina ou albumina bovina (RAY, WUEPPER, 1979).

Vários estudos têm correlacionado atividade proteolítica extracelular *in vitro* com a virulência de espécies de *Candida*, destacando-se *C. albicans*. A produção de Sap também está associada a diversos fatores de virulência, incluindo formação de hifa, adesão e variabilidade fenotípica (“phenotypic switching”), o que realça o envolvimento desta enzima nos vários processos relacionados à patogenicidade de *C. albicans* (NAGLIK, CHALLACOMBE, HUBE, 2003).

Tem-se demonstrado que as Saps facilitam a aderência a muitos tecidos do hospedeiro e tipos celulares (NAGLIK, CHALLACOMBE, HUBE, 2003). Vários estudos mostram redução na capacidade aderência de *Candida* spp. na presença de pepstatina A, inibidor de Saps (BORG, RUCHEL, 1988; CONSOLARO et al., 2006; EL-MAGHARABI et al., 1990; OLLERT et al., 1993; PICHOVA et al., 2001; RAY, PAYNE, 1988), bem como associa-se a expressão de genes da subfamília *SAP4 – SAP6* à formação de hifas em *C. albicans* (HUBE et al., 1994; WHITE, AGABIAN, 1995).

Embora outros fatores, além da secreção de proteinase, sejam relacionados com a patogenicidade das espécies de *Candida*, diversos experimentos em camundongos utilizando cepas deficientes de produção desta enzima demonstraram que existe uma forte correlação entre a expressão das proteinases e o grau de virulência de diferentes isolados (KWON-CHUNG et al., 1985; ROSS et al., 1990).

Em CVV, com relação à atividade de proteinase, demonstrou-se que isolados de *C. albicans* oriundos de pacientes sintomáticas eram significativamente mais proteolíticos (1,5 a 2 vezes) que isolados vaginais oriundos de pacientes assintomáticas (AGATENSI et al., 1991; CASSONE et al., 1987; DE BERNARDIS et al., 1990). Em outro estudo, verificou-se que cepas de *C. albicans* obtidas de pacientes portadoras de HIV com candidíase vulvovaginal produziram níveis de proteinase significativamente maiores (4 vezes) em relação a isolados obtidos de pacientes portadoras de HIV assintomáticas e de pacientes não-portadoras de HIV com esta enfermidade

(DE BERNARDIS et al., 1999). Assim, evidencia-se o possível papel das proteinases durante o processo infeccioso da CVV *in vivo*.

### **2.1.3 Morfogênese como fator de virulência em *C. albicans***

Dependendo das condições do meio em que se encontra, *C. albicans*, assim como diversos outros fungos, pode crescer como levedura unicelular, denominada de blastoconídio, ou apresentar-se como formas filamentosas, denominadas pseudo-hifa ou hifa verdadeira (BERMAN, SUDBERY, 2002; ROMANI, BISTONI, PUC CETI, 2003; WHITEWAY, BACHEWICH, 2007). As diversas morfologias geralmente coexistem em culturas e durante a infecção do hospedeiro, podendo ser encontradas em todos os tecidos infectados, como demonstrado histopatologicamente (SUDBERY, GOW, BERMAN, 2004).

Sendo assim, *C. albicans* é considerada um fungo pleomórfico ou polimórfico, uma vez que transita por três diferentes morfologias, incluindo: blastoconídio (célula oval que se origina por brotamento), pseudo-hifa (cadeia de células alongadas cuja separação da célula mãe não ocorre durante o processo de brotamento, apresentando constrições antes de cada novo brotamento) e hifa verdadeira (filamento linear formado por células septadas e com constrição não visível, de crescimento apical; BERMAN, SUDBERY, 2002; TEN CATE et al., 2009). Além destas formas relacionadas com infecção, *C. albicans* também pode apresentar clamidoconídios, estruturas de resistência com parede espessa formadas em condições adversas (FABRY et al., 2003).

Tem-se discutido bastante os papéis relativos das diversas formas apresentadas por *C. albicans* durante a colonização de pele e mucosas e, posteriormente, na invasão da corrente sanguínea e de tecidos mais profundos (CASADEVALL, PIROFSKI, 2003; GOW, BROWN, ODDS, 2002; SAVILLE et al., 2003; WACHTLER et al., 2011).

No estado comensal, a levedura se encontra, em geral, sob a forma de blastoconídios; enquanto o estado filamentoso, incluindo pseudo-hifas e hifas verdadeiras, está mais relacionado com a invasão das barreiras do hospedeiro. Acredita-se que os blastoconídios são importantes para adesão, disseminação e transmissão da levedura; e parecem estar associados com a colonização. Já as formas filamentosas (pseudo-hifas e hifas verdadeiras) têm capacidade

invasora tissular e ocasionam a sintomatologia própria da infecção, contribuindo para a virulência de *C. albicans* (CALDERONE, FONZI, 2001; KARKOWSKA-KULETA, RAPALA-KOSIK, KOZIK, 2009; ODDS, GOW, BROWN, 2001).

Da mesma maneira, em CVV, os sintomas estão relacionados à forma filamentosa, que é capaz de invadir a mucosa vaginal e causar danos à mesma (CONSOLARO et al., 2005; ODDS et al., 1988). Contudo, segundo Sobel, Muller e Buckley (1984), que realizaram estudos com uma cepa variante de *C. albicans* incapaz de formar hifas a 37°C, a capacidade de *C. albicans* produzir hifas parece ser um fator de virulência importante, mas não essencial para a patogênese da CCV, uma vez a cepa variante foi capaz de causar infecção em um modelo animal experimental de candidíase vulvovaginal.

A capacidade de transitar de forma reversível entre as morfologias de levedura e hifa está associada à virulência de *C. albicans* (LO et al., 1997). Durante a infecção de humanos e animais por *C. albicans*, as hifas predominam no sítio primário de penetração em camadas de células epiteliais e tecidos, enquanto células na forma de levedura são encontradas geralmente ou na superfície epitelial ou emergindo de hifas que estão invadindo os tecidos (SCHERWITZ, 1982; RAY, PAYNE, 1988).

Um estudo demonstrou expressão do gene *HWP1*, que codifica a proteína Hwp1 (“hyphal wall protein” 1), envolvida na morfogênese (NANTEL et al., 2002; SHARKEY et al., 1999; STAAB, FERRER, SUNDSTROM, 1996; STAAB et al., 1999), tanto em amostras de pacientes infectados por *C. albicans* (candidíase oral e vaginal) quanto em amostras de pacientes colonizados por *C. albicans* nas mucosas orais e vaginais, indicando papel da proteína Hwp1 e, portanto, da morfogênese, também em interações benignas de *C. albicans* com o hospedeiro humano (colonização; NAGLIK et al., 2006).

A morfogênese pode ser induzida por muitos mecanismos, que são ativados por vários fatores desencadeadores ambientais que podem ter diferentes efeitos na superfície celular fúngica. Participam desse processo vários genes que codificam reguladores para a formação de hifa, incluindo *CPH1* (“*Candida* pseudohyphal regulator” 1), *EFG1* (“enhanced filamentous growth” 1; LO, et al., 1997) e *HGC1*, que codifica uma ciclina hifa-específica (ZHENG, WANG, 2004).

A expressão de proteínas da parede celular é altamente regulada durante a transição levedura-hifa e, dentre os genes mais expressos durante essa mudança, estão os que codificam proteínas específicas de hifas, tais como Hwp1 (“hyphal wall protein” 1), Hyr1 (“hyphally regulated protein” 1) e Als3 (“agglutinin-like sequence” 3; BAILEY et al., 1996; HOYER et al., 1998; STAAB, FERRER, SUNDSTROM, 1996; SWOBODA et al., 1995; WALKER et al., 2009). Estas proteínas são os principais antígenos e também funcionam como adesinas e invasinas que podem modular as respostas imunológicas (LIU, FILLER, 2011; LUO et al., 2010).

Observam-se várias diferenças em componentes da parede celular quando se compara a forma leveduriforme (blastocóndio) com a forma filamentosa (hifa) de *C. albicans*. As proteínas da parede celular das hifas contém menor quantidade de ligações fosfodiéster de  $\beta$ -1,2-mano-oligossacarídeos, bem como as células de hifas contém aproximadamente 3 a 5 vezes mais quitina em relação às células na forma de levedura. Apesar do conteúdo de  $\beta$ -1,3-glucana entre levedura e hifa ser similar, este componente pode ser menor exposto na superfície celular da hifa (GANTNER, SIMMONS, UNDERHILL, 2005).

Assim, apesar dos componentes básicos da parede celular de *C. albicans* serem os mesmos tanto na forma leveduriforme quanto na forma filamentosa, as proteínas de superfície e as quantidades de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) apresentados às células imunes diferem substancialmente entre uma morfologia e outra. Sendo assim, a morfogênese (transição levedura-hifa) influencia o reconhecimento do fungo pelo sistema imunológico do hospedeiro e a resposta imunológica desencadeada (GOW et al., 2012).

Além disso, as condições nas quais as células crescem podem causar mudanças substanciais na parede celular, mesmo sem alteração da morfologia da célula (GOW, BROWN, ODDS, 2002). *C. albicans* provavelmente apresenta formas de hifa com diferenças sutis em diferentes nichos do hospedeiro, influenciando a resposta imune de uma maneira nicho-específica (GOW et al., 2012).

Não se sabe, até o momento, quais as diferenças das pseudo-hifas, em relação às leveduras e hifas, quanto à estrutura e propriedades químicas da parede celular e ao seu reconhecimento pelo sistema imunológico.

Vários fatores ambientais influenciam e modulam a formação de hifa através de diversas vias. Sabe-se que dipeptídeo muramil (XU et al., 2008), CO<sub>2</sub> (HALL et al., 2010), glicose e aminoácidos (FENG et al., 1999; HUDSON et al., 2004; MAIDAN et al., 2005), baixos níveis de nitrogênio (MAIDAN et al., 2005), pH neutro a alcalino (BAEK, MARTIN, DAVIS, 2006; LOTZ, 2004), hipóxia (STICHTERNOOTH et al., 2011; STICHTERNOOTH, ERNST, 2009), incorporação física em uma matriz (STICHTERNOOTH, ERNST, 2009) e estresses genotóxicos (SHI, Q. M. et al., 2007) causados por substâncias químicas como o peróxido de hidrogênio (DA SILVA DANTAS et al., 2010), espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas nos fagócitos (GOW et al., 2012) e hidroxirúria, que causam dano ao DNA ou inibem sua replicação (BACHEWICH, THOMAS, WHITEWAY, 2003; LENG, SUDBERY, BROWN, 2000); ou por radiação ultravioleta, podem induzir o desenvolvimento de hifas através da ativação de diferente cascatas de sinalização (GOW et al., 2012). Por outro lado, temperaturas abaixo de 35 °C (SHAPIRO et al., 2009) e o farnesol (DEVEAU et al., 2010), uma molécula “quorum sensing” que se acumula em altas densidades celulares de *C. albicans*, inibem a formação de hifas.

Durante a infecção, *C. albicans* é fagocitada por macrófagos e neutrófilos (GOW et al., 2012), células de defesa do hospedeiro, porém consegue sobreviver devido à rápida conversão à morfologia de hifa (LORENZ, BENDER, FINK, 2004), uma vez que as espécies reativas de oxigênio geradas em células fagocíticas induzem o estresse genotóxico, como o peróxido de hidrogênio, que ativa o desenvolvimento de hifa através de sinalização por Rad53, uma quinase “checkpoint” (DA SILVA DANTAS et al., 2010).

#### **2.1.4 Biofilme como fator de virulência em *C. albicans***

Segundo Donlan e Costerton (2002), biofilme consiste em uma comunidade sésil microbiana caracterizada por células que estão irreversivelmente aderidas a um substrato, a uma interface, ou umas às outras,

embebidas numa matriz extracelular polimérica produzida por estas células e apresentando fenótipo alterado no que diz respeito à taxa de crescimento e à transcrição gênica em relação às células planctônicas homólogas flutuantes.

Biofilmes de *Candida* apresentam alta resistência aos agentes antifúngicos e aos mecanismos de defesa do hospedeiro (RAMAGE et al., 2001), o que dificulta a sua eliminação, servindo como reservatório de micro-organismos. Além disso, bactérias e outros fungos, além de *Candida*, podem coexistir no mesmo biofilme, caracterizando biofilmes mistos (DOUGLAS, 2002).

Os biofilmes constituem o tipo de crescimento microbiano predominante na natureza e são decisivos no desenvolvimento de infecções (O'TOOLE, KAPLAN, KOLTER, 2000). Diversas manifestações infecciosas causadas por *C. albicans* estão associadas com a formação de biofilmes, principalmente infecções relacionadas a dispositivos médicos, tais como próteses (válvula cardíaca, de joelho, etc.), implantes (lentes, de mama, etc.), tubos endotraqueais e vários tipos de cateteres, os quais favorecem a colonização e formação de biofilme por *Candida* (RAMAGE et al., 2001).

As infecções associadas à utilização de dispositivos médicos invasivos relacionam-se com a formação de biofilmes nesses biomateriais. Nesses casos, as células do micro-organismo podem invadir os tecidos em contato com o dispositivo ou se desprender para a corrente sanguínea, causando infecção (DONLAN, 2001).

Biofilmes de *C. albicans* também são encontrados em tecidos vivos, como em superfícies mucosas do hospedeiro (DONGARI-BAGTZOGLU et al., 2009; HARRIOTT et al., 2010; HASAN et al., 2009). Um estudo comprovou a formação de biofilme de *C. albicans* em mucosa vaginal, *in vivo*, utilizando um modelo animal de vaginite (HARRIOTT et al., 2010), porém ainda não é claro se células de *Candida* sempre se encontram organizadas em biofilmes maduros na mucosa vaginal ou apenas nos períodos em que a carga fúngica aumenta, como no caso da exacerbação de sinais e sintomas, durante a infecção.

Critérios clínicos propostos para infecções relacionadas a biofilmes em mucosas incluem: sinais e sintomas de infecção, apesar de culturas negativas, cronicidade ou recorrência com exacerbações e remissões periódicas e

resposta mínima ou nula aos antimicrobianos (STOODLEY et al., 2005), indicando que a formação de biofilme por espécies de *Candida* pode ter um papel relevante na ocorrência de CVVR.

Alguns fatores que interferem na formação do biofilme são o tipo e o número de células que aderem ao dispositivo, as características físico-químicas da superfície que constitui o dispositivo e o meio fluido a que os microorganismos estão expostos (DONLAN, 2001). Outros fatores, como a presença de saliva e soro, também têm demonstrado efeito positivo na adesão inicial e formação de biofilme (NIKAWA et al., 1997; RAMAGE et al., 2001).

O crescimento do biofilme depende da existência de nutrientes no meio e da difusão destes através da matriz exopolimérica, assim como da eliminação de resíduos. Outros fatores também interferem na maturação do biofilme, tais como o pH interno, a difusão do oxigênio dissolvido e a osmolaridade (O'TOOLE, KOLTER, 1998).

Ao final do processo de formação do biofilme, um equilíbrio dinâmico é estabelecido e o crescimento de células é compensado pela libertação de células planctônicas. Estudos sugerem que a expressão gênica regula o desenvolvimento primário (fase de adesão), a secreção da matriz exopolimérica e a maturação dos biofilmes, controlando a densidade populacional através da transmissão de sinais entre as células (COSTERTON et al., 1995).

Sabe-se que o processo de formação do biofilme é, ao menos em parte, controlado por moléculas “quorum sensing”, responsáveis pela comunicação intercelular em bactérias e fungos, de forma análoga às citocinas produzidas pelas células dos mamíferos (COSTERTON, STEWART, GREENBERG, 1999).

Recentemente, duas moléculas “quorum sensing” secretadas por *C. albicans* foram identificadas: farnesol e tirosol (MUKHERJEE et al., 2005), embora outras moléculas como ácidos graxos de cadeia curta, também possam atuar na comunicação intercelular (DAVIES, MARQUES, 2009).

O farnesol previne a formação de hifas (HORNBY et al., 2001), além de influenciar inúmeras cascatas de sinalização durante a formação do biofilme, afetando a expressão de genes envolvidos na resistência aos antifúngicos, na manutenção da parede celular, no transporte de ferro, na hidrofobicidade da superfície celular e na resposta ao estresse (CAO et al., 2005).

Há muita informação disponível sobre a estrutura e propriedade de biofilmes bacterianos, entretanto muito menos se sabe sobre biofilmes fúngicos (RAMAGE et al., 2001; DOUGLAS, 2002).

O desenvolvimento e as características do biofilme de *C. albicans* têm sido descritos por diversos autores (BAILLIE, DOUGLAS, 1999; HAWSER, BAILLIE, DOUGLAS, 1998; NIKAWA et al., 1998) e apresentam várias propriedades similares às dos biofilmes bacterianos, tais como a heterogeneidade estrutural, a presença de material exopolimérico e sua reduzida sensibilidade aos antimicrobianos e biocidas. Contudo, destacam-se algumas diferenças com relação ao biofilme bacteriano típico, como o fato de *C. albicans* ser capaz de apresentar diferentes formas, desde a forma de levedura até a forma filamentosa, o que confere características únicas ao desenvolvimento do biofilme. Tendo em vista que infecções por *C. albicans* associadas ao desenvolvimento de biofilme constituem um problema clínico ascendente, com um limitado arsenal terapêutico, é bastante importante que sejam realizadas pesquisas nessa área (RAMAGE et al., 2001).

Segundo Ramage et al. (2001), que estudaram as características do desenvolvimento de biofilme em *C. albicans*, há inicialmente um período de aderência (0-2 h), seguido da formação de microcolônias (2-4 h). Posteriormente, ocorre a transição de formas leveduriformes com brotamentos para formas filamentosas com pseudo-hifas e hifas verdadeiras (4-6 h). Então, as microcolônias são interligadas pelo alongamento das hifas, formando uma monocamada confluenta (6-8 h). A complexidade do biofilme aumenta com o tempo e o mesmo adquire uma forma tridimensional com heterogeneidade espacial quando maduro (8-48 h). O fator mais importante para a aquisição da arquitetura tridimensional são as formas filamentosas, enquanto as células leveduriformes se localizam na camada basal. Assim, a variedade morfológica é um fator essencial para a formação de biofilme e para o potencial patogênico de *C. albicans*.

Ramage et al. (2001) demonstraram, através da técnica não-destrutiva CSLM (“Confocal laser scanning microscopy”), que os biofilmes de *C. albicans* possuem heterogeneidade estrutural e exibem uma típica arquitetura micro colônia/canal de água similar ao descrito para biofilmes bacterianos, o que

facilita o influxo de nutrientes, a eliminação de resíduos e o estabelecimento de micro nichos em todo o biofilme.

Levando-se em consideração que uma divisão celular aleatória não poderia resultar na heterogeneidade e complexidade espacial apresentada por biofilmes intactos avaliados por diferentes técnicas, cogita-se que a comunicação célula-célula e sistemas de expressão gênica altamente regulados participam desse processo (RAMAGE et al., 2001).

Estudos demonstram que genes relacionados à adesão, pertencentes à família *ALS*, são superexpressos em biofilmes de *C. albicans* (CHANDRA et al., 2001; GREEN et al., 2004). Além disso, sabe-se que *ALS1* e *ALS3* são dois dos principais genes relacionados à formação de biofilmes (NAILIS et al., 2009; NOBILE et al., 2012). De fato, as proteínas que medeiam a adesão às células do hospedeiro e a materiais inertes constituem um dos fatores predominantes no desenvolvimento e manutenção dos biofilmes de *Candida* (CUÉLLAR-CRUZ et al., 2012).

Além disso, demonstrou-se maior expressão dos genes *SAP5*, *SAP6* e *SAP9* em biofilmes de *C. albicans* do que em células planctônicas desta levedura (GARCIA-SANCHEZ et al., 2004).

A formação de biofilme por *C. albicans* também está diretamente ligada à sua capacidade de filamentação (morfogênese), tendo em vista que mutantes defeituosos em formar hifas também apresentaram deficiência na formação de biofilme, relacionando-se a capacidade de formação de biofilme aos fatores de transcrição também envolvidos em cascatas de sinalização de morfogênese, como Efg1 (HARRIOTT et al., 2010; LEWIS et al., 2002; RAMAGE et al., 2002) e Cph1 (LEWIS et al., 2002), bem como à proteína Hwp1 (NOBILE et al., 2006b), presente na parede celular das hifas, destacando-se que a relação entre biofilme e morfogênese também foi demonstrada *in vivo*, utilizando um modelo animal de vaginite (HARRIOTT et al., 2010).

Além disso, o fator de transcrição Bcr1 também está envolvido na formação de biofilme *in vitro* e *in vivo*, uma vez que sua ausência determina biofilmes finos fracamente aderentes, com pouca produção de matriz extracelular (NOBILE et al., 2006a; NOBILE, MITCHELL, 2005).

Biofilmes de mutantes incapazes de produzir crescimento leveduriforme foram mais facilmente destacados da superfície do cateter em relação aos tipos

selvagens, sugerindo que a camada basal de leveduras tem um importante papel em promover a fixação do biofilme na superfície (BAILLIE, DOUGLAS, 1999).

## 2.2 CANDIDÍASE VULVOVAGINAL (CVV)

Candidíase vulvovaginal (CVV) é uma infecção da vulva e da vagina, causada pelas várias espécies de *Candida*, leveduras comensais que podem se tornar patogênicas sob determinadas condições que alterem o ambiente vaginal (FIDEL, 2002). Esta enfermidade foi descrita pela primeira vez em 1949 por Wilkinson, que estabeleceu uma relação entre a existência de fungos na vagina e o aparecimento de vaginite (ZIARRUSTA, 2002).

A CVV é um dos diagnósticos mais frequentes em ginecologia, sendo a segunda infecção genital mais frequente nos Estados Unidos e no Brasil, cuja incidência tem aumentado drasticamente na última década, representando 20 a 25% dos corrimentos vaginais de natureza infecciosa (ÁLVARES, SVIDZINSKI, CONSOLARO, 2007; CORSELLO et al., 2003; SOBEL, 1993).

Vários autores indicam *C. albicans* como o principal agente responsável pela CVV, respondendo por 80 a 90% dos casos, enquanto que 10 a 20% destes são devido a espécies de *Candida* não-*C. albicans*, dentre elas: *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. parapsilosis*. (DAN, POCH, LEVIN, 2002; FERRAZZA et al., 2005; SOBEL, 1992). Pelo fato de *C. albicans* fazer parte da microbiota humana normal, a doença apresenta um evidente caráter oportunista (LACAZ et al., 2002)

A colonização por *Candida* spp. ocorre em 20 a 25% das mulheres adultas e saudáveis, sabendo-se que 75% das mulheres em idade reprodutiva apresentam pelo menos um episódio de CVV em sua vida (SOBEL, 1988). Destas, 40 a 50% vivenciam novas infecções e 5% desenvolvem a forma recorrente (CVVR), demonstrando a importância da colonização vaginal prévia para o desenvolvimento da infecção (FIDEL, SOBEL, 1996; MARDH et al., 2002).

O CDC ("Center for Disease Control") classifica esta infecção fúngica em duas categorias: simples e recorrente. A infecção denominada de simples tem gravidade leve à moderada, episódios esporádicos, não recorrentes, em uma

hospedeira normal, geralmente causada por uma cepa de *Candida* sp. sensível aos antifúngicos comumente utilizados (SOBEL et al., 1998). Entretanto, a CVVR é definida usualmente pela ocorrência de três ou mais episódios de CVV ao ano (FIDEL, SOBEL, 1996; MARDH et al., 2002).

Apesar de ainda não ter havido total elucidação da causa da CVVR, há duas hipóteses: reinfecção a partir de reservatórios em sítios extragenitais, como o trato gastrointestinal, ou através da transmissão sexual (LI et al., 2008; MARDH, NOVIKOVA, STUKALOVA, 2003; MILES, OLSEN, ROGERS, 1977; SCHROPPEL et al., 1994) e recidiva como resultado da erradicação incompleta da cepa de *Candida* da vagina (SOBEL, 1985). Dessa maneira, mais estudos se fazem necessários para a elucidação da fonte de infecção em mulheres com CVV recorrente.

### **2.2.1 Quadro clínico x imunidade**

A invasão epitelial por *Candida* spp. ocasiona liberação de uma série de substâncias (prostaglandinas e bradicininas) com capacidade de induzir um processo inflamatório local, ocasionando edema, eritema e aumento do fluido vaginal (ZIARRUSTA, 2002). A sintomatologia parece não ter associação com a concentração de *Candida* spp. na vagina (CONSOLARO et al., 2004; GIRALDO et al., 2000; LINHARES et al., 2005).

O quadro clínico clássico da CVV é inespecífico, podendo ocorrer diagnóstico incorreto. Consiste em: prurido vulvar intenso (que pode determinar lesões satélites vulvares, como escoriações e fissuras), eritema vulvovaginal, edema, dispareunia e disúria, além de leucorréia (corrimento branco, grumoso, com aspecto caseoso, levemente aderido à parede vaginal; FIDEL, 2002; NYIRJESY, 2001; SOBEL, 1999; Figura1).



**Figura 1** – Aspecto clínico de candidíase vulvovaginal (CVV). Fonte: Health Canada, Sexual health and STI section, Clinical Slide Gallery, obtida do site <http://www2a.cdc.gov/>

Acredita-se que o papel da levedura e seus atributos de virulência não sejam o principal fator determinante do desencadeamento da CVV, mas sim a própria resposta imunológica do hospedeiro (FIDEL et al., 2004). Assim, sugere-se que a evolução clínica da CVV esteja relacionada ao sistema imune, e que a recorrência vaginal seja devido a uma disfunção ou deficiência no sistema imunológico (FIDEL, SOBEL, 1998; WEISSENBAACHER et al., 2000).

Há controvérsias quanto ao papel exato da imunidade inata e/ou adaptativa na susceptibilidade a CVV e CVVR. Estudos de infecção experimental utilizando camundongos, assim como avaliações clínicas, sugerem que a imunidade adaptativa não desempenhe nenhum papel na proteção contra CVV, à medida que a deficiência na mesma não predispõe à ocorrência deste tipo de infecção (LEIGH et al., 2001; SCHUMAN et al., 1998; WORMLEY, CUTRIGHT, FIDEL, 2003). Além disso, a presença de anticorpos e de células T *Candida*-específicos não proporciona proteção contra esta enfermidade (DE CARVALHO et al., 2003; FIDEL, SOBEL, 2002), acreditando-se que haja uma imunorregulação ou tolerância da imunidade adaptativa com relação a *Candida* em humanos e em modelos experimentais utilizando-se camundongos, com o intuito de evitar processos inflamatórios no trato reprodutivo em resposta a uma levedura comensal, que pode fazer parte da microbiota vaginal (FIDEL, 2005).

Acredita-se que a imunidade inata seja considerada associada com resistência e susceptibilidade a CVV e CVVR e, além disso, que o papel dos PMNs (polimorfonucleares) seja mínimo ou ausente no combate a infecções

vaginais por *Candida*, diferentemente das infecções sistêmicas, onde desempenham papel fundamental no combate à candidemia (FIDEL, 2004). Infecções sintomáticas são associadas com infiltrado inflamatório e alta carga fúngica, enquanto que proteção contra infecções assintomáticas está associada com um processo não inflamatório e ausência de infiltrado inflamatório por PMNs (BAROUSSE et al., 2001). Estes resultados sugerem que CVV seja causada devido a uma reação agressiva pelos PMNs ao invés de uma deficiência na resposta adaptativa. Assim, os PMNs, além de não protegerem contra a infecção, causariam danos à mucosa, promovendo o aparecimento dos sinais e sintomas característicos de CVV (FIDEL et al., 2004).

Tem-se relatado o papel da célula epitelial da mucosa vaginal na CVV. É postulado que sinais liberados pelas células epiteliais vaginais, seguidos de interação com *Candida*, iniciam-se em mulheres susceptíveis à apresentação de sinais e sintomas associados a PMNs (FIDEL, 2004). Também se constatou uma atividade anti-*Candida* por parte da célula epitelial, que agiria, então, como parte da resposta imune inata do hospedeiro protetora contra CVV (BAROUSSE et al., 2005). Desta maneira, proteção contra infecção é usualmente associada à falta de sinais dados pelas células epiteliais que induzam a resposta de PMNs e, possivelmente, com uma atividade anti-*Candida* mais forte (FIDEL, 2004).

### **2.2.2 Formas de transmissão da candidíase vulvovaginal**

A maioria das infecções por *C. albicans* são de origem endógena decorrentes da proliferação ou da mudança de sítio da levedura, induzidos por alguns fatores predisponentes do hospedeiro ou fatores do patógeno, mas também pode existir a possibilidade de ocorrerem infecções exógenas (FERRER, 2000).

As leveduras podem ser carreadas para a vagina por meio de processo de transmissão endógena a partir da região perianal, tendo como fonte a microbiota normal do próprio intestino ou a troca com o parceiro por via sexual (FIDEL, SOBEL, 1996; MARDH, NOVIKOVA, STUKALOVA, 2003; MILES, OLSEN, ROGERS, 1977). Contudo, a CVV não deve ser considerada uma

DST (Doença Sexualmente Transmissível) no sentido estrito, visto que acomete mulheres celibatárias, além do gênero *Candida* fazer parte da microbiota vaginal, embora se verifique uma maior frequência de CVV em mulheres com atividade sexual regular (SOBEL, 1997).

Em geral, espécies de *Candida* permanecem na mucosa vaginal apenas como colonizantes e, uma vez encontrando condições apropriadas, aceleram o processo de multiplicação e expressam fatores de virulência, culminado com a invasão da mucosa e ocasionando a CVV sintomática ou ainda, podendo constituir reservatório para reinfecções posteriores (FIDEL, SOBEL, 1996).

A infecção fúngica da genitália externa alcança grande expressão durante a gestação (VASCONCELLOS, AZEVEDO, ROCCO, 1996), possibilitando a transmissão neonatal durante o parto, no caso de a genitora estar colonizada por *Candida* spp. (DENNERSTEIN, 1998).

Embora a transmissão intra-uterina não tenha usualmente sido investigada, parece provável que o fungo penetre pelas membranas íntegras, de modo que lesões de cordão umbilical, membranas e placenta já foram descritas. Apesar disso, esta forma de transmissão é incomum, a despeito da alta prevalência na gestação, por determinação de algum mecanismo de proteção ainda desconhecido (MORAES, 1996).

### 2.2.3 Fatores predisponentes

Tanto fatores locais como sistêmicos podem contribuir para a invasão tecidual por *Candida* spp. A intensa multiplicação do micro-organismo no canal vaginal é favorecida por uma série de fatores predisponentes (ÁLVARES, SVIDZINSKI, CONSOLARO, 2007).

O início e aumento da frequência das relações sexuais e demais práticas, além do contato com mais de um parceiro, aumentam a incidência da infecção. A presença de vários sítios de colonização no parceiro sexual também tem sido referida como associada à CVV por *C. albicans* (SOBEL et al., 1998; VAL, ALMEIDA, 2001).

Na prática, a infecção vaginal por *C. albicans* geralmente é associada a situações de debilidade do hospedeiro ou aquelas em que o teor de glicogênio do meio vaginal está elevado. A gravidez, o uso de contraceptivos orais de

altas doses e a terapia de reposição hormonal, por serem situações de hiperestrogenismo, acarretam altos níveis de glicogênio, também observado no diabetes mellitus não controlado. O aumento dos níveis de glicogênio resulta em maior disponibilidade do substrato nutricional de leveduras e na diminuição do pH local, favorecendo a infecção da mucosa vaginal (DENNERSTEIN, 1998; GOSWAMI et al., 2005; SOBEL et al., 1998; ZIARRUSTA, 2002).

Os bacilos de Döderlein (lactobacilos) formam ácido láctico a partir do glicogênio, cuja produção e secreção são estimuladas pelos estrogênios. Este mecanismo propicia uma acidez adequada (pH 4,5) do ambiente vaginal, dificultando a infecção pela maioria dos patógenos. As leveduras do gênero *Candida* são exceções, pois proliferam também em ambiente ácido, conseguindo sobreviver em ambiente considerado hostil para uma gama de outros micro-organismos (VAL, ALMEIDA FILHO, 2001).

Além disso, um ambiente hiperestrogênico aumenta a exposição dos complexos epiteliais glicoproteicos que atuam como receptores, facilitando assim, a aderência da levedura na superfície epitelial (ZIARRUSTA, 2002). Contudo, a expressão dos genes de adesão por cepas de *C. albicans*, em CVV, parece não estar correlacionada aos níveis de estrogênio (NAS et al., 2008).

Sabe-se que o estrógeno também promove a formação de tubo germinativo (CHENG, YEATER, HOYER, 2006; WHITE, LARSEN, 1997), primeiro passo para a transição levedura-hifa (morfogênese; WHITEWAY, BACHEWICH, 2007).

A presença de ciclos menstruais regulares tem sido identificada como relevante fator de risco para a CVV, com maior incidência de casos a partir do pico de estradiol, especialmente no período pré-menstrual, onde se observa um mecanismo imunossupressor natural da mucosa vaginal induzido pela progesterona, que inibe a imunidade celular local contra *C. albicans*, sabendo-se que a CVV é menos frequente em situações de baixa de estrogênio, como na pré-menarca, pós-menopausa e no período de lactação (DENNERSTEIN, 1998; ROSA, RUMEL, 2004; ZIARRUSTA, 2002).

O uso de antibióticos, sistêmicos ou tópicos, parece estar relacionado à destruição da microbiota bacteriana vaginal, particularmente dos bacilos de Döderlein, diminuindo a competição por nutrientes e espaço e favorecendo o

crescimento, adesão e posterior germinação dos micro-organismos do gênero *Candida* (SOBEL, 1990; ZIARRUSTA, 2002).

A associação de rinite e outras doenças alérgicas com a CVV vem sendo descrita há vários anos, especialmente na sua forma recorrente (HOLANDA et al., 2007; MORAES, 1996).

Doenças da tireóide, corticoterapia, drogas imunossupressoras e infecção por HIV parecem aumentar o risco de infecção por constituírem situações de debilidade do hospedeiro, tendo em vista o caráter de patógeno oportunista das espécies do gênero *Candida* (SOBEL et al., 1998; VAL, ALMEIDA FILHO, 2001). Entretanto, a queda do número de linfócitos T CD4 tem sido descrita como não estritamente relacionada com a candidíase vulvovaginal (FIDEL, LYNCH, SOBEL, 1995).

O uso de absorventes internos e duchas vaginais parece não estar associado à CVV (SOBEL et al., 1998) . Por outro lado, o dispositivo intrauterino (DIU) tem sido associado a episódios de CVV, provavelmente por agir como reservatório devido ao surgimento de biofilme microbiano na sua superfície externa, resultando na proteção das leveduras contra a ação dos antifúngicos (AULER et al., 2001; MARRIE, COSTERTON, 1983; ZIARRUSTA, 2002).

Especula-se ainda que hábitos higiênicos inadequados podem ser fatores predisponentes para a contaminação vaginal, dentre eles a higiene anal realizada no sentido do ânus para a vagina, levando resíduos de fezes para as roupas íntimas, favorecendo o desenvolvimento da CVV. Além disso, pequenos traumas como o ato sexual e o uso de roupas íntimas justas e/ou sintéticas, que determinam pouca aeração nos órgãos genitais, aumentando a umidade, também predis põem à CVV (HOLANDA et al., 2007; ROSA, RUMEL, 2004).

### 2.3 TIPAGEM DE CEPAS DE *C. albicans*

O interesse em conhecer o relacionamento genético de isolados da mesma espécie tem crescido rapidamente na medida em que se aprofundam os conhecimentos a respeito da epidemiologia de uma variedade de doenças fúngicas. Assim como as abordagens genéticas moleculares evoluíram em desvendar a biologia básica de fungos patogênicos, os métodos para obter a

“impressão digital” dos mesmos em nível genético também sofreram modificações que levaram à sua evolução (SOLL, 2000).

Apesar da recente disponibilidade de técnicas para obter a “impressão digital” do DNA ter proporcionado aos investigadores e clínicos ferramentas para monitoramento de cepas e identificação de fontes de infecções, a variedade de métodos e o baixo nível de sofisticação aplicada na maioria dos casos para a análise de dados tem levado a problemas de interpretação. Nem todos os métodos disponíveis são igualmente efetivos; e alguns podem até mesmo gerar informações erradas. No caso de infecções fúngicas, nenhuma técnica específica tornou-se o método dominante. De fato, cada método tem suas vantagens e desvantagens (SOLL, 2000).

*C. albicans* é uma levedura oportunista que pode causar infecções invasivas graves, especialmente em pacientes imunocomprometidos, tornando essencial o desenvolvimento de metodologias que permitam a diferenciação acurada entre as diversas cepas. O conhecimento do relacionamento genético de cepas envolvidas em infecções é de extrema relevância para o desenvolvimento e a aplicação da correta estratégia terapêutica, assim como para um melhor entendimento da epidemiologia desta levedura. Além disso, algumas cepas são capazes de invadir diferentes localizações anatômicas, podendo ocorrer microevolução como uma resposta adaptativa a novos ambientes (SOLL, 2000).

No estudo de Sampaio et al. (2005), demonstrou-se que os pacientes podem apresentar diferentes clones de *C. albicans* em diferentes sítios anatômicos, porém a população infectante em cada sítio anatômico é monoclonal.

Vários estudos suportam a ideia de que *C. albicans* possui genes potencialmente benéficos que são ativados por mudanças no número de cromossomos e que esse elaborado mecanismo regula a utilização de nutrientes e possivelmente outras funções importantes em resposta ao estresse ambiental (RUSTCHENKO, HOWARD, SHERMAN, 1994; SAMPAIO et al., 2005; TSANG et al., 1999).

A evolução da virulência em fungos patogênicos humanos, como *C. albicans*, tem ocorrido largamente através de mecanismos similares, como a

duplicação gênica e a expansão de famílias de genes, principalmente em regiões subteloméricas (MORAN, COLEMAN, SULLIVAN, 2011).

Como as populações clínicas de *C. albicans* são geralmente clonais, na ausência de troca genética através da reprodução sexuada, a microevolução poderia conferir uma vantagem seletiva sob condições ambientais adversas (SAMPAIO et al. 2005).

Alguns fatores que podem levar à perda de heterozigose devido a alterações cromossômicas são o uso de fluconazol (PEREPNIKHATKA et al., 1999), o choque térmico (HILTON et al., 1985) e a exposição a diferentes fontes de carbono, tais como L-sorbose e D-arabinose (JANBON, SHERMAN, RUSTCHENKO, 1999; RUSTCHENKO, HOWARD, SHERMAN, 1994).

Diversos métodos moleculares têm sido utilizados para diferenciar cepas de *C. albicans*, incluindo cariotipagem eletroforética (BARCHIESI et al., 1995), uso de sondas espécie-específicas tais como Ca3 ou 27A em análise de enzima de restrição (MAGEE, SOUZA, MAGEE, 1987; SCHMID et al., 1999), métodos baseados em PCR (“Polimerase Chain Reaction”; BARCHIESI et al., 1997; CORREIA et al., 2004; THANOS et al., 1996) e, mais recentemente, tipagem de sequência multilocus (MLST), que avalia sequências de nucleotídeos de vários genes e apresenta satisfatório poder discriminatório (BOUGNOUX, MORAND, D’ENFERT, 2002; TAVANTI et al., 2003).

### **2.3.1 Genotipagem ABC**

Um dos primeiros métodos moleculares utilizado para diferenciação de cepas de *C. albicans* empregava uma simples técnica de análise de polimorfismos de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) de DNA celular para dividir os isolados em dois grandes grupos com base na posição de uma banda dimórfica (cepas do grupo A tem uma banda de 3,7 kb e cepas do grupo B tem uma banda de 4,2 kb), então subdivididos em tipos (SCHERER, STEVENS, 1987). Este método mostrou-se confiável e reprodutível (STEVENS, ODDS, SCHERER, 1990).

Estudos pela mesma metodologia relataram cepas de *C. albicans* com genótipos incomuns, sendo designadas genótipo C (cepas com ambas as bandas: 3,7 e 4,2 kb) e genótipo D (cepas com nenhuma banda; CLEMONS et

al., 1997; MCCULLOUGH et al., 1998; MCCULLOUGH, CLEMONS, STEVENS, 1998).

Posteriormente, demonstrou-se que a inserção de um íntron transponível de 379 nucleotídeos no DNA codificador do rRNA da subunidade ribossomal maior (gene 25S rRNA ou 25S rDNA) era responsável pela banda maior (4,2 kb) em isolados de *C. albicans* do genótipo B, enquanto a banda menor (3,7 kb) do genótipo A não apresentava este inserto (MERCURE, MONTPLAISIR, LEMAY, 1993). Verificou-se que um íntron na mesma posição estava presente em cepas de *C. dubliniensis*, porém apresentava 300 nucleotídeos a mais em relação ao apresentado pelo genótipo B de *C. albicans* (BOUCHER et al., 1996).

Uma PCR desenhada para amplificar a região 25S rDNA resultou em um produto único para isolados de *C. albicans* do genótipo A (450 pb) e do genótipo B (840 pb) e para isolados de *C. dubliniensis* (1080 pb), enquanto isolados de *C. albicans* do genótipo C apresentaram dois produtos principais (450 pb e 840 pb; MCCULLOUGH, CLEMONS, STEVENS, 1999a).

Sugere-se que isolados do genótipo C tenham sua origem da união sexual entre isolados do genótipo A e isolados do genótipo B, podendo estar em processo de perda ou aquisição do íntron na região 25S rDNA ou ter um genótipo estável (MCCULLOUGH, CLEMONS, STEVENS, 1999a).

Tamura et al. (2001) relataram a descoberta de um novo genótipo de *C. albicans* avaliando a região codificadora do gene 25S rRNA, verificando que dois isolados, dentre 301 amostras clínicas obtidas no Japão, apresentavam um íntron transponível com 962 pb, maior do que aquele apresentado por *C. dubliniensis*, classificando-os como sendo do genótipo E e sugerindo transferência horizontal do íntron do grupo I entre *C. dubliniensis* e *C. albicans*.

No estudo de Mccullough, Clemons e Stevens (1999a), verificou-se que todos os isolados testados de *C. albicans* pertencentes ao genótipo D apresentaram produtos de PCR idênticos àqueles apresentados por *C. dubliniensis*, indicando que as cepas previamente designadas como *C. albicans* genótipo D são, de fato, *C. dubliniensis*, devendo ser atribuídas a esta espécie.

*C. dubliniensis* é uma espécie recentemente reconhecida, primariamente isolada da cavidade oral de pacientes portadores de HIV, fenotipicamente muito relacionada a *C. albicans*, sendo difícil a distinção entre estas espécies

por métodos laboratoriais de rotina (SULLIVAN et al., 1995). Relatou-se que *C. dubliniensis* é suscetível à mesma variedade de agentes antifúngicos que *C. albicans* (SULLIVAN, COLEMAN, 1998), constatando-se que *C. dubliniensis* é mais suscetível ao fluconazol que *C. albicans* (genótipos A, B e C; MCCULLOUGH, CLEMONS, STEVENS, 1999a).

Por outro lado, os resultados obtidos em diversos estudos sugerem que há correlação entre os genótipos de *C. albicans* e a susceptibilidade aos antifúngicos (MCCULLOUGH, CLEMONS, STEVENS, 1999a; MERCURE, MONTPLAISIR, LEMAY, 1993; STEVENS, ODDS, SCHERER, 1990).

No estudo de Sugita et al. (2002), avaliaram-se 56 isolados clínicos de *C. albicans* pertencentes a genótipos distintos (A, B, C) quanto à expressão diferencial de produção de fosfolipase e proteinase, dois importantes fatores de virulência, demonstrando que cepas do genótipo B tinham atividades de proteinase e fosfolipase significativamente maiores em relação a cepas dos genótipos A e C.

Sardi et al. (2011) demonstraram que isolados clínicos de *C. albicans* obtidos de sítios subgengivais pertencentes ao genótipo A apresentaram maior atividade hemolítica e hidrofobicidade em relação a isolados do genótipo B oriundos do mesmo sítio.

Assim, verificam-se diferenças na expressão de diversos fatores de virulência entre os genótipos de *C. albicans* (A, B, C), sugerindo que a genotipagem de *C. albicans* é importante para a compreensão da sua patogênese.

### **2.3.2 Genotipagem por microssatélites**

Microssatélites ou repetições simples em tandem consistem em trechos de um a seis nucleotídeos repetidos em tandem através do genoma e que têm um alto nível de polimorfismo comparado ao de outros marcadores moleculares, estando entre os marcadores mais frequentemente utilizados para propósitos de diferenciação devido a sua hipervariabilidade, facilidade de amplificação por PCR e interpretação e seu potencial para uso em ensaios automatizados (BRETAGNE et al., 1997; FIELD et al., 1996; SAMPAIO et al., 2005).

Em geral, encontram-se três níveis diferentes de polimorfismo em microssatélites, relacionando-se ao comprimento total ou ao número de repetições de nucleotídeos; à estrutura da região repetida; e a mutações pontuais dentro ou fora da região repetida (FAN et al., 2008).

Em leveduras, os loci de microssatélites têm tamanhos que variam consideravelmente, tendo estes polimorfismos rapidamente se tornado marcadores atraentes para uma variedade de análises, incluindo tipagem de cepas (DALLE et al., 2000; HENNEQUIN et al., 2001; SHEMER et al., 2001), análise de estrutura de população (FUNDYGA, LOTT, ARNOLD, 2002; LOTT et al., 2003) e estudos epidemiológicos (MEYER et al., 1999; SAMPAIO et al., 2003; SAMPAIO et al., 2005).

Vários loci polimórficos de microssatélites tem sido identificados no genoma de *C. albicans*, a maioria deles localizados próximos a *EF3* (BRETAGNE et al., 1997), *CDC3* e *HIS3* (BOTTEREL et al., 2001); ou dentro de regiões codificadoras *ERK1*, *2NF1*, *CCN2*, *CPH2* e *EFG1* (METZGAR et al., 1998), apesar do poder discriminatório calculado para estes loci ser relativamente baixo (entre 0,77 e 0,91). Um valor mais alto, 0,97, foi estimado para o microssatélite CAI (SAMPAIO et al., 2003), localizado em uma região não-codificante, na qual se espera encontrar maior polimorfismo. SAMPAIO et al. (2005) realizaram PCR multiplex com o intuito de avaliar 5 loci de microssatélites em regiões não-codificantes (CAI, CAIII, CAV, CAVI, CAVII), descobrindo tratar-se de uma ferramenta altamente eficiente para a diferenciação de cepas de *C. albicans* de forma rápida e acurada, além de permitir a identificação de eventos microevolucionários.

O “primer” M13, que corresponde a uma sequência de um minissatélite, tem sido utilizado para a tipagem de isolados de *Cryptococcus neoformans* (MEYER et al., 1999), entre outras leveduras, incluindo espécies de *Candida*, *Sacharomyces cerevisiae* e *Rhodotorula rubra* (CHAVES, SANTOS, COLOMBO, 2012; RUHNKE et al., 1999; XU et al., 1999), bem como *Cryptococcus laurentii* (FERREIRA-PAIM et al. 2012). Casali et al. (2003), utilizando o “primer” M13 para tipagem de isolados de *Cryptococcus neoformans*, diferenciaram e agruparam satisfatoriamente os isolados deste fungo provenientes de regiões geográficas diferentes, além de caracterizarem

subgrupos geneticamente distintos, demonstrando o poder discriminatório deste “primer”.

### 2.3.3 RAPD

A técnica de RAPD (“Randomly Amplified Polymorphic DNA”) utiliza “primers” randômicos de aproximadamente 10 pb, os quais se ligam em diversas regiões ao longo do genoma, gerando vários produtos de amplificação, sendo um dos métodos mais utilizados para genotipagem de fungos patogênicos (SOLL, 2000).

Purjol et al. (1997) demonstraram que o método de RAPD apresenta a mesma complexidade de dados e poder de resolução em relação a técnicas complexas utilizando sondas e eletroforese de enzimas multilocus.

Vários “primers” tem sido utilizados na genotipagem de isolados de *C. albicans* por RAPD, incluindo os “primers” OPE-3 e OPE-18, que apresentaram bom poder discriminatório (PURJOL et al., 1997; SOLL, 2000)

Contudo, a técnica de RAPD apresenta problemas de reprodutibilidade não apenas entre laboratórios, mas também no mesmo laboratório ao longo do tempo, o que torna difícil o desenvolvimento de um banco de dados universal (SOLL, 2000).

### 2.3.4 Tipagem de cepas de *C. albicans* x candidíase vulvovaginal

Estudos demonstram a maior prevalência do genótipo A em isolados vaginais de *C. albicans*. No estudo de Odds et al. (2006), observou-se, dentre 6 isolados vaginais e um isolado de colo uterino, maior prevalência do genótipo A (42,9%) em relação ao genótipo B (28,6%) e genótipo C (28,6%), embora poucos isolados tenham sido avaliados; enquanto no estudo de Jacobsen et al. (2008), nove dentre dez pacientes com CVV apresentaram isolados vaginais de *C. albicans* do genótipo A; e em outro estudo, avaliando 84 isolados de *C. albicans* obtidos de pacientes com CVV, observou-se que todos os isolados pertenciam ao genótipo A (EMMANUEL et al., 2012).

Li e Bai (2007) avaliaram o polimorfismo do microssatélite CAI por “Single-strand conformation polymorphism” (SSCP) e verificaram que, dentre

cepas independentes de *C. albicans* oriundas de escarro, urina, fezes, sangue e fluido pleural, poucas apresentavam modelo CAI SSCP igual ou altamente similar. No entanto, Fan et al. (2008) demonstraram que cepas independentes de *C. albicans* associadas com candidíase vulvovaginal (CVV) tinham, em sua maioria, genótipos CAI iguais ou parecidos, resumindo-se a quatro genótipos dominantes raramente encontrados em cepas de outras fontes (LI, BAI, 2007), o que sugere a existência de cepas de *C. albicans* com tropismo para a vagina.

Contudo, Lattif (2011), avaliando genótipos de isolados clínicos de *C. albicans* oriundos de pacientes com CVV através da técnica de Southern blot com a sonda “*Candida albicans* repetitive element-2” (CARE-2), observou que 95% dos isolados apresentavam perfis distintos e não eram relacionados geneticamente.

Sampaio et al., (2003) encontraram 100% de concordância entre os genótipos apresentados por isolados vaginais e isolados anais simultaneamente obtidos de pacientes com CVVR, analisando polimorfismos no locus CAI de microssatélite. Shi W. et al. (2007) verificaram, utilizando marcadores rápidos de microssatélites em loci de genes conservados (*CDC3*, *EF3*, *HIS3*), que 80% das pacientes com CVV apresentavam a mesma cepa de *C. albicans* na região genital e no reto, enquanto Lin, Li e Zuo (2011) constataram, em 92% das situações, alta homologia entre isolados vaginais e intestinais de *Candida* spp. oriundos de pacientes com CVV, utilizando PCR da região ITS e a técnica de RAPD.

Vários estudos têm sido realizados sobre a epidemiologia da CVV, contudo a fonte da infecção permanece incerta, havendo duas hipóteses principais para a causa de CVV recorrente: reinfecção a partir de reservatórios em sítios extragenitais, como o trato gastrointestinal, ou através da transmissão sexual (LI et al., 2008; MARDH, NOVIKOVA, STUKALOVA, 2003; MILES, OLSEN, ROGERS, 1977; SCHROPPEL et al., 1994) e recidiva como resultado da erradicação incompleta da cepa de *Candida* da vagina (SOBEL, 1985).

Assim, faz-se necessária a investigação da distribuição genotípica das cepas de *C. albicans* a partir de amostras da vagina de mulheres assintomáticas e de sítios extragenitais de mulheres com CVV, sobretudo do trato gastrointestinal e da cavidade oral, além de amostras do pênis e da

cavidade oral de homens, com o intuito de auxiliar na elucidação da fonte de infecção em mulheres com CVV recorrente (FAN et al, 2008).

Vários estudos avaliaram o relacionamento genético entre isolados vaginais de *Candida* spp. obtidos sequencialmente de pacientes com CVVR, verificando a ocorrência de três situações: manutenção, microevolução ou substituição da cepa ao longo do tempo (AMOURI et al. 2012; CHONG et al. 2003; CHONG et al. 2007; LOCKHART et al. 1996; SAMPAIO et al. 2003; SAMPAIO et al. 2005).

Nos estudos de Sampaio et al. (2003), analisando polimorfismos no locus CAI de microssatélite e de Sampaio et al. (2005), que investigou 5 loci de microssatélites (CAI, CAIII, CAV, CAVI, CAVII), observou-se maior prevalência de manutenção da cepa, enquanto nos estudos de Chong et al. (2003) e Chong et al. (2007), através de técnicas de RAPD com “primers” distintos, bem como no estudo de Lockhart et al. (1996), utilizando a técnica de Southern blot, verificou-se maior prevalência de microevolução da cepa ao longo do tempo.

Contudo, Amouri et al. (2012), investigando 3 loci de microssatélites (CAI, CAIII, CAIV), observaram maior prevalência de substituição da cepa ao longo do tempo, contrariando os resultados encontrados nos estudos citados anteriormente.

Lian et al. (2004), utilizando técnica de RAPD, não observaram diferença significativa entre os genótipos apresentados pelos isolados de *C. albicans* obtidos de diferentes grupos de pacientes (com CVVR, CVV esporádica e colonização), indicando não haver associação entre o genótipo. apresentado pela cepa de *C. albicans* e a condição clínica da paciente.

Contrariamente, Chong et al. (2007) observaram que a similaridade genética entre os isolados de *Candida* spp. obtidos de grupos de pacientes com CVVR e CVV esporádica foi relativamente baixa, indicando a possível existência de genótipos relacionados à condição clínica.

Chong et al. (2003) verificaram menor similaridade genética entre os isolados de *C. albicans* obtidos do grupo de pacientes com CVVR em relação à apresentada pelos isolados obtidos do grupo de pacientes com CVV esporádica, diferentemente do encontrado por Fan et al. (2008) e Amouri et al. (2012), que verificaram maior prevalência dos genótipos dominantes, com menor distribuição de genótipos, nos isolados de *C. albicans* obtidos de

pacientes com CVVR em relação aos isolados obtidos de pacientes com CVV esporádica.

No estudo de Fan et al. (2008), verificou-se correlação entre genótipos de cepas de *C. albicans* com a gravidade da CVV, uma vez que se obteve forte evidência estatística de que pacientes com CVV grave apresentavam uma frequência de cepas de *C. albicans* pertencentes aos genótipos dominantes mais alta em relação às pacientes com CVV de leve a moderada (FAN et al., 2008).

Certamente, a identificação de genótipos específicos de *C. albicans* relacionados à gravidade da CVV é de grande importância para o diagnóstico e tratamento desta enfermidade (FAN et al., 2008).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem por finalidade avaliar os fatores de virulência e genótipos de isolados clínicos de *C. albicans* sequencialmente obtidos de ânus e vagina de pacientes com CVV.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1 Avaliar os achados micromorfológicos de *C. albicans* encontrados ao exame direto das amostras clínicas (secreção vaginal e secreção anal) e verificar a sua concordância com os resultados da cultura destas amostras;
- 3.2.2 Verificar a quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC) obtidas a partir das amostras clínicas sequenciais de ânus e vagina;
- 3.2.3 Caracterizar fenotipicamente cepas colonizantes (isolados anais) e infectantes (isolados vaginais de pacientes com sinais e sintomas de CVV) de *C. albicans* (estocados em banco de micro-organismos ou coletados recentemente) quanto aos fatores de virulência, incluindo a capacidade de aderir a células epiteliais humanas, a atividade de proteinase, a capacidade de morfogênese (transição levedura-hifa) e a formação de biofilme;
- 3.2.4 Correlacionar a expressão dos atributos de virulência das referidas cepas entre si e com as manifestações clínicas, os fatores predisponentes e o uso de antifúngicos, levando-se em consideração dados clínicos obtidos das pacientes participantes do estudo;
- 3.2.5 Avaliar possíveis relacionamentos genéticos entre os diferentes isolados, avaliando-se pares de isolados clínicos (cepa anal e cepa vaginal) e sequências do mesmo sítio através de genotipagem ABC, genotipagem por microssatélites e por RAPD.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 TIPO DE ESTUDO

Este é um estudo transversal, o qual se caracteriza pela observação direta de uma determinada população, composta por um número pré-estabelecido de unidades de observação, num determinado espaço de tempo.

### 4.2. OBTENÇÃO DAS CEPAS DE *C. albicans* AVALIADAS NESTE ESTUDO

#### 4.2.1 Isolados de *C. albicans* estocados em banco de micro-organismos

Foram analisadas 25 cepas de *C. albicans* selecionadas de uma coleção de culturas do Laboratório de Micologia do Hospital Giselda Trigueiro, obtidas de 12 pacientes após a menarca, com quadro clínico compatível com CVV recorrente, excluindo-se do estudo pacientes com evidências clínicas de neoplasias malignas e AIDS.

As pacientes foram atendidas no ambulatório da Maternidade Escola Januário Cicco da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) e em duas clínicas particulares durante o período de maio de 2003 a maio de 2005 e dados das mesmas foram coletados em fichas clínicas gentilmente cedidas.

O projeto de pesquisa, conduzido pela professora do Departamento de Infectologia da UFRN, Eveline Pipolo Milan, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRN sob Cadastro 44/03 e todas as pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

A maioria das cepas de *C. albicans* selecionadas do banco de leveduras do Laboratório de Micologia do Hospital Giselda Trigueiro compreenderam pares de isolados da região anal (colonização) e da região vaginal (infecção) obtidos da mesma paciente, bem como isolados vaginais obtidos ao longo de coletas realizadas sequencialmente em uma mesma paciente.

#### 4.2.1.1 Verificação de viabilidade, pureza e identificação fenotípica dos isolados de *C. albicans* estocados em banco de micro-organismos

Previamente aos experimentos, as cepas estocadas no banco de micro-organismos foram submetidas à verificação de sua pureza e viabilidade. Para tanto, foram reativadas em meio YPD (“Yeast peptone dextrose”; extrato de levedura 10 g/L; dextrose 20g/L; peptona 20g/L) líquido, e incubadas em incubadoras rotatórias (TE-420 incubadora, Tecnal) a 37 °C por 48 h. Em seguida, foram semeadas em meio ágar Sabouraud dextrose (Sabouraud Dextrose Agar, Difco™, USA) contendo cloranfenicol (0,05 mg/mL; Arifenicol®, Ariston), incubando-se a 37°C por 48 h.

Para avaliação da pureza, as leveduras foram semeadas com alça de níquel-cromo pela técnica de esgotamento, em placas de Petri (90x15 mm) contendo meio CHROMagar Candida® (CHROMagar™ Candida, Difco, USA), meio cromogênico seletivo, que permite a identificação de culturas mistas de leveduras. As placas foram incubadas a 37°C ± 2 durante 24 a 72 h, sendo a positividade para *C. albicans* ou *C. dubliniensis* observada para as culturas que apresentaram colônias de coloração verde com diferentes intensidades (BAUMGARTNER, FREYDIERE, GILLE, 1996; WARREN, HAZEN, 1995).

As colônias oriundas do meio CHROMagar Candida® foram identificadas por microcultivo em ágar Fubá com tween 80 (fubá 40 g/L; ágar bacteriológico 20 g/L; Tween 80 12 mL/L) e pelo perfil bioquímico através de metodologia clássica (KURTZMAN, FELL, 1998; SIDRIM, ROCHA, 2004). Também foi realizada a triagem fenotípica de *C. dubliniensis* através dos testes de tolerância à temperatura de 42°C (COLEMAN et al., 1997) e do caldo hipertônico (ALVES et al., 2002).

Com a finalidade de criar um banco de micro-organismos próprio para este estudo, todas as cepas foram cultivadas em meio YPD (“Yeast Peptone Dextrose”; extrato de levedura 10 g/L; dextrose 20g/L; peptona 20g/L) “overnight” a 30 °C, estocadas em tubos de congelamento contendo 20% de glicerol e armazenadas em freezer a -80 °C.

## 4.2.2. Isolados clínicos de *C. albicans* obtidos recentemente

### 4.2.2.1 População do estudo

Foram incluídas no estudo 10 mulheres após a menarca, sem neoplasias malignas ou AIDS, apresentando quadro clínico compatível com CVV esporádica ou recorrente, atendidas no ambulatório de ginecologia da Maternidade Escola Januário Cicco (MEJC) da UFRN ou no Laboratório Integrado de Análises Clínicas (LIAC) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFRN no período de novembro de 2011 a agosto de 2012.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Onofre Lopes sob o protocolo 595/11 (Anexo A). Todas as pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A).

### 4.2.2.2 Coleta de dados

Dados completos destas pacientes foram obtidos mediante a aplicação de um questionário (Apêndice B). O questionário foi respondido com o auxílio da paciente e do ginecologista, no momento da coleta das amostras e após a assinatura do Termo de Consentimento.

### 4.2.2.3 Coleta das amostras

Foram coletadas amostras sequenciais de secreção anal e vaginal das pacientes com um intervalo de uma semana a um mês entre as coletas. A coleta da amostra clínica foi realizada pelo ginecologista quando a paciente foi atendida na MEJC, e por profissional habilitado quando a paciente foi atendida no LIAC.

A coleta foi realizada da seguinte maneira:

- Inseriu-se uma zaragatoa (“swab”) no introito vaginal ou no ânus, fazendo-se movimentos de rotação para coletar o material;

- A zaragatoa foi removida e inserida em um tubo contendo 2 mL de solução salina (0,9% de NaCl) com cloranfenicol (0,05 mg/mL; Arifenicol<sup>®</sup>, Ariston) estéril.

Para transporte do material, as amostras clínicas foram acondicionadas a 4°C por até 24 horas e encaminhadas ao Laboratório de Micologia Médica e Molecular do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFRN, para posterior processamento das mesmas.

#### 4.2.2.4 Processamento das amostras

A partir das amostras clínicas (secreção vaginal e secreção anal), realizou-se o exame direto, observando-se o sedimento obtido após centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos da suspensão das amostras em salina, aplicando-se 20 µL do mesmo sobre uma lâmina, cobrindo-se com lamínula e observando-se em microscopia óptica (Olympus CX21; 400 x de magnificação).

O material obtido das pacientes foi semeado nos seguintes meios de cultura: meio cromogênico e diferencial CHROMagar Candida<sup>®</sup> (CHROMagar<sup>™</sup> Candida, Difco, USA), com auxílio de “swab”, através da técnica dos sete pontos equidistantes com o intuito de isolar a levedura e detectar a possível presença de mais de uma espécie de *Candida* (cultura mista) através da coloração apresentada (BAUMGARTNER, FREYDIERE, GILLE, 1996); ágar Sabouraud-dextrose (Sabouraud Dextrose Agar, Difco<sup>™</sup>, USA) com cloranfenicol (0,05 mg/mL; Arifenicol<sup>®</sup>, Ariston) e rosa de bengala (0,025 mg/mL; Rosa de Bengala, Vetec) semeado por meio da adição de 100 µL da suspensão das amostras (secreção vaginal e secreção anal) em solução salina (0,9% de NaCl) obtida a partir da coleta, utilizando-se uma alça de Drigalski através da técnica de distensão, com o intuito de formar um filme homogêneo na superfície da placa que possibilitasse a contagem de colônias. As placas foram incubadas a 30°C, durante 96 horas. Colônias de cores diferentes, ou ainda, colônias de mesma cor, mas que apresentaram características fenotípicas distintas (tamanho, textura, tonalidade), foram isoladas separadamente para que se procedesse à identificação. Determinou-se o

número de unidades formadoras de colônia (UFC) das leveduras crescidas em ágar Sabouraud-dextrose com cloranfenicol e rosa de bengala.

#### 4.2.2.5 Armazenamento das leveduras isoladas

Com a finalidade de criar um banco de micro-organismos próprio para este estudo, todas as cepas de levedura foram cultivadas em meio YPD (“Yeast Peptone Dextrose”; extrato de levedura 10 g/L; dextrose 20g/L; peptona 20g/L) “overnight” a 30 °C, estocadas em tubos de congelamento contendo 20% de glicerol e armazenadas em freezer a -80 °C.

#### 4.2.2.6 Critério de inclusão das leveduras isoladas

Foram inclusos no estudo apenas isolados clínicos de *C. albicans*, excluindo-se isolados de outras espécies de *Candida* ou de outros gêneros de levedura. Priorizou-se a inclusão de isolados de *C. albicans* que constituíam pares (isolado vaginal e isolado anal) obtidos simultaneamente da mesma paciente e/ou sequências obtidas do mesmo sítio (vaginal ou anal) ao longo de coletas realizadas sequencialmente em uma mesma paciente.

### 4.3 IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS ISOLADAS

#### 4.3.1 Micromorfologia

As colônias que apresentaram coloração verde no CHROMagar Candida<sup>®</sup> foram submetidas à prova do microcultivo. Cada amostra foi semeada, com o auxílio de alça de níquel-cromo, em três estrias paralelas sobre placa de Petri (90 X 15 mm) contendo ágar fubá com Tween-80 (fubá 40 g/L; ágar bacteriológico 20 g/L; tween 80 12 ml/L). As estrias feitas sobre o ágar foram cobertas com lamínula esterilizada e a placa incubada a 30°C, durante 48 a 96 horas. As leituras foram realizadas diariamente, em microscópio óptico (Olympus CX21), com objetivas de 10X e 40X, para a observação de clamidoconídios, que confirmam a identificação de *C. albicans* ou *C. dubliniensis*, bem como de outras estruturas morfológicas, a saber:

blastoconídios, artroconídios, pseudohifas e outros, quando se tratavam de outras leveduras (SIDRIM, ROCHA, 2004). Leveduras apresentando colônias de outras cores (diferente da coloração verde, esperada para *C. albicans*/*C. dubliniensis*) no CHROMagar Candida<sup>®</sup> ou que não formaram clamidoconídios na prova do microcultivo foram submetidas a provas bioquímicas, pela metodologia clássica (subitens 4.3.4 e 4.3.5).

#### **4.3.2 Triagem fenotípica de *C. dubliniensis* através do teste de tolerância à temperatura de 42°C**

Com a finalidade de verificar a capacidade de crescimento das leveduras a 42°C, uma UFC de cada isolado suspeito (clamidoconídio positivo) foi semeada em tubo com YPD sólido inclinado, incubando-se a 42°C por 48 horas. Isolados que não exibiram nenhum crescimento foram considerados suspeitos de *C. dubliniensis*, havendo necessidade de realização de métodos moleculares para a confirmação da identificação. Os isolados que exibiram crescimento foram identificados como *C. albicans* (COLEMAN et al., 1997).

#### **4.3.3 Triagem fenotípica de *C. dubliniensis* através do teste do caldo hipertônico**

Cada isolado suspeito (clamidoconídio positivo) foi semeado em 1mL de Sabouraud caldo (dextrose 40g/L; peptona 10g/L) acrescido de NaCl (Cloreto de sódio P. A., Vetec) 6,5%, e incubado durante 96 horas, 37°C. As culturas foram examinadas visualmente para verificação de crescimento (turbidez) em intervalos de 24 h. As leveduras capazes de turvar o meio foram identificadas como *C. albicans*. Aquelas incapazes de provocar a turvação em até 96 horas, receberam identificação presuntiva de *C. dubliniensis* (ALVES et al., 2002).

#### **4.3.4 Prova de assimilação de hidratos de carbono (auxanograma)**

O perfil bioquímico das leveduras que não exibiram formação de clamidoconídio foi estudado quanto a sua capacidade de assimilação de

carbono. As fontes de carbono utilizadas foram: dextrose (D-glucose monohidratada P.A., Cinética), maltose (Maltose D (+), Reagen), sacarose (Sacarose P.A., Reagen), galactose (D (+) galactose puríssima, Vetec), lactose (Lactose 1 hidrato P.A., QEEL), trealose (Trealose D (+) Dihidratada P.A., Vetec), melibiose (D (+) Melibiose monohidratada, Vetec), celobiose (Vetec), xilose (D (+) Xilose, Reagen), rafinose (Rafinose D (+) puríssima pentahidratada, Vetec), dulcitol (Dulcitol puro, Vetec), ramnose (L (+) Ramnose, Vetec), manitol (Manitol P.A., Vetec) e inositol (Inositol P. A., Vetec). Uma suspensão da levedura foi preparada em água destilada esterilizada, ajustando a turbidez de acordo com o padrão 5 da escala de MacFarland. O meio C [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g/L; MgSO<sub>4</sub> 0,5g/L; ágar 20g/L] foi fundido e estabilizado em banho-maria (Quimis, Q334M) a 50°C. Para verificar a assimilação de fontes de carbono foram adicionados 2mL da suspensão a 40mL do meio C, em seguida vertidos em placa de Petri de 150 x 15mm. Após a solidificação do meio, as fontes de carbono foram distribuídas equidistantemente sobre o ágar. A placa foi incubada a 30°C, durante 24-96 horas. A leitura foi realizada diariamente, sendo a positividade observada através do surgimento de halo de crescimento, na área correspondente a cada fonte de carbono (KURTZMAN, FELL, 1998).

#### **4.3.5 Prova de fermentação de açúcares (zimograma)**

O perfil bioquímico das leveduras que não exibiram formação de clamidoconídio foi estudado quanto a sua capacidade de fermentação de açúcares, em que foram empregados os açúcares dextrose (D-glucose monohidratada P.A., Cinética), maltose (Maltose D (+), Reagen), sacarose (Sacarose P.A., Reagen), galactose (D (+) galactose puríssima, Vetec), lactose (Lactose 1 hidrato P.A., QEEL), trealose (Trealose D (+) Dihidratada P.A., Vetec) e rafinose (Rafinose D (+) puríssima pentahidratada, Vetec), dissolvidos a 4% em água peptonada (peptona 2,5g/L, extrato de levedura 0,5g/L). Da suspensão de cada levedura, em água destilada esterilizada, com turbidez compatível com o padrão 5 da escala de MacFarland, foram inoculados 200µL em tubos de ensaio contendo, cada um deles, meio de fermentação, tubo de Durham e o respectivo açúcar a ser estudado. Os tubos foram incubados a

30°C, por 28 dias, sendo a leitura realizada diariamente, observando-se a produção gás (formação de bolha no interior do tubo de Durham; KURTZMAN, FELL, 1998).

#### **4.3.6 Cepas de referência**

Para a identificação fenotípica dos isolados de levedura obtidos, utilizou-se como controle a cepa de *C. albicans* ATCC 90028, enquanto na triagem fenotípica de *C. dubliniensis*, as cepas de *C. albicans* ATCC 90028 e de *C. dubliniensis* CBS 7987 foram incubadas concomitantemente às amostras clínicas, como referência para o padrão de crescimento.

### **4.4 ANÁLISE FENOTÍPICA DE *C. albicans* QUANTO AOS DIFERENTES FATORES DE VIRULÊNCIA**

#### **4.4.1. Caldo NGY para padronização do inóculo**

Para a caracterização fenotípica dos diferentes isolados quanto aos fatores de virulência, as amostras foram inicialmente crescidas em meio NGY (neopeptona 1g/L; dextrose 4g/L; “bacto yeast extract” 1g/L). Quando as células são inoculadas por “wet looping” neste meio (com uma alça em anel carregada por um filme de suspensão de leveduras rapidamente imersa no meio e removida) e incubadas por 18-24 h em incubadora rotatória (TE-420 incubadora, Tecnal) a 30 °C, 200 rpm, um inóculo de aproximadamente  $2 \times 10^8$  células/mL é produzido (CHAVES et al., 2007).

#### **4.4.2. Ensaio de aderência de *C. albicans* a células epiteliais humanas**

Células de *C. albicans* foram crescidas “overnight” em NGY. Amostras de células epiteliais bucais humanas (CEBH) foram coletas de voluntários saudáveis com “swab” estéril friccionado por 2 min na cavidade oral e transferidos para tubos Falcon contendo 5 mL de PBS (Phosphate Buffered Saline; NaCl 8g/L; KCl 0,2g/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub> 1,44g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24 g/L, pH 7,2) e mantidas refrigeradas até o momento de experimentação. Suspensões de *C.*

*albicans* e CEBH foram centrifugadas (Excelsa<sup>®</sup>4, MOD 280R) a 1200 g (4 °C) por 5 min e lavadas três vezes com PBS. O inóculo foi padronizado para  $5 \times 10^6$  células/mL (*C. albicans*) e  $5 \times 10^5$  células/mL de CEBH. Os dois tipos de células foram misturados em iguais proporções (100 µL de cada suspensão), em triplicata e, em seguida, foram incubados a 37 °C, 200 rpm, por 1h. Subsequentemente, as células foram fixadas em formalina (solução de formaldeído a 10% em PBS) e o número de células de *C. albicans* aderidas em 150 CEBH foi determinado após contagem em microscópio óptico (Olympus CX21) com objetiva de 40x (BATES et al., 2006).

#### **4.4.3. Ensaio para detecção de atividade de proteinase em *C. albicans***

Alíquotas contendo 200 µL de células de *C. albicans* crescidas em NGY foram transferidas para tubos Falcon contendo 5 mL de meio YCB (“Yeast Carbon Base”, Difco<sup>™</sup>) + 0,5% de BSA (“Bovine Serum Albumine”, Sigma, USA), utilizado para induzir a secreção de proteinase; e incubadas a 30 °C, 200 rpm, por 72 h. A turbidez da cultura ( $DO_{600\text{ nm}}$ ) foi determinada em espectrofotômetro (Biochrom, Libra S32). Estes tubos foram centrifugados (Hanil Science Industrial, Supra 2K) a 4300 g, 25°C, por 30 minutos, a fim de remover restos celulares. Após centrifugação, um volume de 250 µL do sobrenadante das culturas foi transferido para os tubos teste e controle (em triplicata). Em seguida, 1 mL de tampão citrato de sódio (ácido cítrico 0,1M 350mL/L, citrato de sódio 0,1M 150mL/L), acrescido de 1% de BSA, pH 3.8, foi adicionado nos tubos teste. Os tubos teste e controle (contendo apenas os sobrenadantes das culturas) foram incubados em banho-maria (Quimis, Q334M) a 37 °C por 1 h. A reação foi interrompida pela adição de 2.5 mL de solução a 5% de ácido tricloroacético (TCA; “Trichloroacetic acid”, Sigma) a cada tubo. Os tubos teste foram incubados no gelo por 10 min e 1 mL do tampão citrato de sódio + 1% de BSA foi adicionado aos tubos controle. Os precipitados foram removidos por centrifugação (Excelsa<sup>®</sup>4, MOD 280R) a 4°C, 3000 rpm por 10 min e a absorbância ( $DO_{280\text{ nm}}$ ) dos sobrenadantes dos tubos teste foi determinada (Biochrom, Libra S32) utilizando-se os sobrenadantes dos tubos controle como branco. A atividade proteolítica foi determinada pelo

aumento de produtos solúveis em TCA ( $DO_{280nm}$ ) em função do crescimento da levedura em meio indutor de proteinase ( $DO_{600nm}$ ; COPPING et al., 2005).

#### 4.4.4 Ensaio de morfogênese de *C. albicans* em meio líquido

Para indução da formação de hifa em meio líquido, células crescidas em NGY foram inoculadas em tubos falcon pré-aquecidos (37 °C) contendo 5 mL de soro fetal bovino (Sigma Chemical Corporation, St Louis, MO, EUA) diluído a 20% em YPD (concentração final de  $2 \times 10^6$  células/mL), incubados à mesma temperatura com rotação de 200 rpm. Após 1h e 3 h de incubação, alíquotas de 200  $\mu$ L de cada cepa foram retiradas e adicionadas à igual volume de formalina (solução de formaldeído a 10% em PBS). Determinou-se a porcentagem de células com evaginação lateral após 1h, enquanto após 3h determinou-se o índice de morfologia (IM; MERSON-DAVIES E ODDS,1989), onde valores próximos a 1 indicam uma população de células de levedura esféricas e um valor próximo a 4 indica uma população de células de hifas verdadeiras, com valores entre 1 e 4 indicando a presença de morfologias variadas ou predominantemente de pseudo-hifas (ODDS, VAN NUFFEL, GOW, 2000). Para tanto, foram observadas 100 células de cada amostra em microscopia óptica (microscópio óptico Olympus CX21).

#### 4.4.5 Formação de biofilme

Para a indução de biofilme, seguiu-se o protocolo de JIN et al. (2003) com algumas modificações. Células de *C. albicans* foram cultivadas em SDA a 37°C por 18 horas. Os isolados foram inoculados em 5 mL do meio YNB ("Yeast Nitrogen Base", Difco™) acrescido de 50mM de glicose (D-glucose monohidratada P.A., Cinética) e incubados "overnight" durante 18 horas a 200 rpm. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a uma velocidade de 5000 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente, sendo o "pellet" formado lavado duas vezes em 5 mL de PBS (Phosphate Buffered Saline; NaCl 8g/L; KCL 0,2g/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub> 1,44g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24 g/L, pH 7,2), em iguais condições de centrifugação. O "pellet" celular foi ressuspensão em 5 mL de PBS

e a concentração celular foi ajustada para  $10^7$  céls/mL em uma densidade óptica (DO) de 0,38 a 520 nm.

Subsequentemente, para a fase de adesão, a suspensão de células de *C. albicans* foi transferida para placas de microtitulação de poliestireno com 96 poços estéreis. Para cada poço da placa foram adicionados 100  $\mu$ L da suspensão, sendo a mesma incubada por 1,5 h a 37° C sob agitação mecânica de 75 rpm.

Após a fase de adesão, a suspensão de células não aderidas foi removida, sendo os poços lavados duas vezes com 150  $\mu$ L de PBS. Imediatamente, um total de 100  $\mu$ L de meio YNB acrescido de 50mM de glicose foi adicionado em cada um dos poços e a placa incubada 66 horas a 37° C sob agitação de 75 rpm. Todos os ensaios foram realizados em quintuplicata. Como controle negativo, oito poços foram tratados de maneira idêntica, excluindo-se os conteúdos celulares. A quantificação do biofilme foi realizada utilizando-se coloração pelo cristal violeta.

#### 4.4.5.1 Coloração do biofilme pelo cristal violeta

Após a indução de biofilme, o meio YNB foi removido, sendo cada poço da placa lavado duas vezes com 150  $\mu$ L de PBS. Após remoção do PBS, a placa foi mantida por 45 minutos à temperatura ambiente para secagem. Em seguida, foram adicionados 110  $\mu$ L de solução aquosa de cristal violeta 0,4% (Sigma Chemical Corporation, St Louis, MO, EUA) em cada poço com incubação por 45 minutos. Sequencialmente, os poços foram lavados três vezes com 300  $\mu$ L de água milli-Q estéril; adicionando-se, em seguida, 200  $\mu$ L de etanol (Álcool Etílico Abosoluto P.A., Vetec) 95% em cada poço com incubação por 45 minutos. Após esse período, 100  $\mu$ L da solução descorante foram transferidos para uma nova placa estéril, quantificando-se em leitor espectrofotométrico de microplacas (Epoch™), com filtro de 570 nm. Para normalização dos resultados, os valores de absorbância dos controles negativos foram subtraídos das amostras teste.

#### 4.4.6 Cepas de referência

Para a análise fenotípica de todos os fatores de virulência em estudo (capacidade de aderência, atividade de proteinase, morfogênese e biofilme), foram utilizadas como referência as cepas de *C. albicans* SC5314 e a ATCC 90028.

#### 4.5 TIPAGEM MOLECULAR

##### 4.5.1 Extração do DNA

Células de *C. albicans* foram semeadas em meio YPD (“Yeast Peptone Dextrose”; extrato de levedura 10 g/L; dextrose 20g/L; peptona 20g/L) líquido e incubadas a 30°C, 200 rpm, “overnight”. Transferiu-se 250 µL da cultura para microtubos de 1,5 mL estéreis. Após centrifugação em microcentrífuga (Eppendorf, 5424 R), utilizando-se a velocidade máxima (13000 rpm) por 2 minutos, o sobrenadante foi removido e desprezado, restando apenas o “pellet”. Foram adicionados 25µL do reagente PrepMan® Ultra (Applied Biosystems) ao microtubo contendo o “pellet” e, após agitação mecânica vigorosa por 5 minutos, os microtubos foram incubados em banho-maria (Quimis, Q334M) à 100°C por 10 min., e centrifugados à velocidade máxima (13000 rpm), por 2 minutos, em microcentrífuga (Eppendorf, 5424 R). Cerca de 25 µL do sobrenadante foram transferidos para microtubos de 1,5mL estéreis e o DNA extraído foi armazenado à -20°C, segundo as recomendações do fabricante.

##### 4.5.2 Quantificação do DNA

O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro específico (Thermo Scientific, NanoDrop 2000), utilizando apenas 2 µL da amostra de DNA e água milli-Q estéril como branco.

As absorbâncias a 260 nm ( $DO_{260\text{ nm}}$ ) e a 280 nm ( $DO_{280\text{ nm}}$ ) de comprimento de onda foram determinadas. Segundo Sambrook et al. (1989), a absorbância a 260 nm igual a 1, contém uma concentração de 50 µg/mL de

DNA dupla fita, 40  $\mu\text{g/mL}$  de DNA fita simples e  $\sim 20 \mu\text{g/mL}$  de oligonucleotídeos de fita simples. A absorvância a 280 nm de comprimento de onda é utilizada para verificar a contaminação da amostra de DNA com proteínas. A razão entre as leituras  $\text{DO}_{260 \text{ nm}}/\text{DO}_{280 \text{ nm}}$  permite uma estimativa da pureza do DNA, que deve apresentar valores entre 1,8 e 2,0. A razão abaixo de 1,6 indica grande quantidade de contaminantes e proteínas e, na sua ocorrência, a extração deve ser realizada novamente.

### 4.5.3 Reações de PCR

#### 4.5.3.1 Genotipagem ABC

Para a técnica de genotipagem ABC, os “primers” CA-INT-L (5'-ATA AGG GAA GTC GGC AAA ATA GAT CCG TAA-3') e CA-INT-R (5'-CCT TGG CTG TGG TTT CGC TAG ATA GTA GAT-3') foram utilizados (MCCULLOUGH, CLEMONS, STEVENS, 1999a).

Para as reações de PCR foram adicionados em microtubos de 0,2 mL os seguintes componentes: 12,5  $\mu\text{L}$  de PCR Master Mix 2X, PROMEGA [Taq DNA polimerase 50 U/mL; deoxinucleotídios (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 400  $\mu\text{M}$  cada);  $\text{MgCl}_2$  3mM], 1  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleotídeo (“primer”) na concentração inicial de 10 pmol/ $\mu\text{L}$ ; 1  $\mu\text{L}$  do DNA genômico diluído a 40 ng/ $\mu\text{L}$  e 9,5  $\mu\text{L}$  de água milli-Q estéril livre de nucleases (PROMEGA), totalizando um volume de 25  $\mu\text{L}$ .

O DNA foi amplificado utilizando um termociclador (Amplitherm, TX 96, Brasil). Foram utilizados os seguintes ciclos de PCR: ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos; seguido de 30 ciclos a 94° C – 1 minuto (desnaturação); 60°C – 1 minuto (hibridização); 72° C- 2 minutos (extensão); e ciclo de extensão final, utilizando a temperatura de 72°C por 5 minutos.

#### 4.5.3.2 Genotipagem por microssatélites e RAPD

Na técnica de genotipagem por microssatélites, utilizou-se o “primer” M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3'; CASALI et al., 2003), enquanto na genotipagem por RAPD, utilizou-se o “primer” B14 (5'-GATCAAGTCC-3').

Para as reações de PCR foram adicionados em microtubos de 0,2 mL os seguintes componentes: 7,5  $\mu\text{L}$  de água milli-Q estéril; 2,5  $\mu\text{L}$  de 10 X “buffer” (Invitrogen Corporation, CA, USA); 5  $\mu\text{L}$  de dNTP mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 1,26 mM cada, Invitrogen Corporation, CA, USA); 3,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  50 mM (Invitrogen Corporation, CA, USA); 5  $\mu\text{L}$  do “primer” M13 ou B14 na concentração de 10 pmol/ $\mu\text{L}$ ; 0,13  $\mu\text{L}$  de Tween 20; 0,4  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase (5 U/ $\mu\text{L}$ ; Invitrogen Corporation, CA, USA) e 1  $\mu\text{L}$  do DNA genômico diluído a 40 ng/ $\mu\text{L}$ , totalizando um volume de 25  $\mu\text{L}$ .

O DNA foi amplificado utilizando um termociclador (Amplitherm, TX 96, Brasil). Foram utilizados os seguintes ciclos de PCR na genotipagem por microssatélites: ciclo de desnaturação inicial a 97°C por 3 minutos; seguido de 45 ciclos a 93° C – 20 segundos (desnaturação); 50°C – 1 minuto (hibridização); 72° C- 2 minutos (extensão); e ciclo de extensão final, utilizando a temperatura de 72°C por 5 minutos; enquanto na genotipagem por RAPD, utilizaram-se os seguintes ciclos de PCR: ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; seguido de 45 ciclos a 94° C – 30 segundos (desnaturação); 36°C – 1 minuto (hibridização); 72° C - 2 minutos (extensão); e ciclo de extensão final, utilizando a temperatura de 72°C por 10 minutos.

#### **4.5.4 Eletroforese em gel de agarose**

O gel de agarose (Ultra Pure Agarose-Invitrogen Corporation, CA, USA) para a eletroforese foi usado na concentração de 1,2% em solução tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) [tris base – 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol 2M (4,84g); ácido acético glacial (1,14 mL); EDTA 0,5M pH 8,0 (2mL), água milli-Q 98 mL]. Os produtos amplificados nas reações de PCR foram diluídos em tampão orange G (OrangeG, Sigma; 20  $\mu\text{L}$  do produto amplificado em 3  $\mu\text{L}$  do tampão orange G) e 1  $\mu\text{L}$  do marcador de peso molecular (100 base pair Ladder / Invitrogen Corporation, CA, USA) foi diluído em 9  $\mu\text{L}$  de água milli-Q estéril e 2  $\mu\text{L}$  do tampão orange G. Foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  do produto amplificado e do marcador de peso molecular diluídos a cada orifício do gel.

Para a corrida eletroforética dos produtos da amplificação por genotipagem ABC, utilizou-se uma voltagem de 95 volts por 2 h; enquanto para a corrida eletroforética dos produtos da amplificação por genotipagem por

microssatélites e RAPD, utilizou-se voltagem de 100 volts por 30 minutos, seguida de voltagem de 55 volts por 4,5 h.

Após o término da eletroforese, o gel foi corado com solução de brometo de etídio (Ethidium bromide, Sigma,) 0,5 µg/mL durante 20 minutos e descorado em água destilada por 10 minutos, sob agitação.

Os padrões de bandas contidos nos géis foram visualizados em um transiluminador de raios UV (Spectroline® Ultraviolet Transilluminator). A imagem gerada foi capturada e armazenada no formato JPEG para análises posteriores com construção de dendrogramas.

#### **4.5.5 Cepas de referência para os métodos de genotipagem**

As cepas de *C. albicans* SC5314 e ATCC 90028 foram utilizadas como controle de cada reação de PCR.

#### **4.5.6 Avaliação da similaridade dos padrões de bandas**

A análise dos resultados gerados pelo método de microssatélites e RAPD foi realizada por dendrograma utilizando o programa GEL COMPAR II (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica) através de análise de agrupamento, de acordo com a similaridade dos padrões de bandas obtidos.

Os géis foram comparados entre si após o aporte de suas imagens pelo programa Gel Compar II. Este programa corrige distorções do gel, como padrões de sorriso, através da comparação com um padrão universal e seleciona automaticamente as bandas presentes no gel. As imagens originais dos géis foram analisadas visualmente para desconsiderar os artefatos. O coeficiente de Dice com tolerância de 2% foi utilizado para esta análise, que se baseia na presença e ausência de bandas, bem como no maior peso para as bandas em comum entre as amostras analisadas para gerar a matriz de similaridade. Para gerar o dendrograma, foi utilizado o método UPGMA (“unweighted pair-group method using arithmetic averages”) que, baseado na matriz de similaridade, faz o grupamento par a par das amostras, gerando desta maneira o grupamento em uma árvore enraizada.

#### **4.6 Análise estatística dos resultados**

Para comparação dos valores dos fatores de virulência entre um isolado e outro, aplicou-se o teste t de Student, utilizando o Microsoft Office Excel<sup>®</sup> 14.0 (Microsoft Corporation).

Para comparação entre grupos de isolados quanto aos fatores de virulência em diversas situações, aplicou-se o teste t não paramétrico de Mann-Whitney, utilizando o GraphPad Prim<sup>®</sup> 5.0 (GraphPad Software, USA).

Para avaliação da correlação entre os fatores de virulência, obteve-se o coeficiente de correlação de Spearman (r), utilizando o GraphPad Prim<sup>®</sup> 5.0 (GraphPad Software, USA).

Em todos os testes estatísticos, considerou-se diferença significativa quando  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

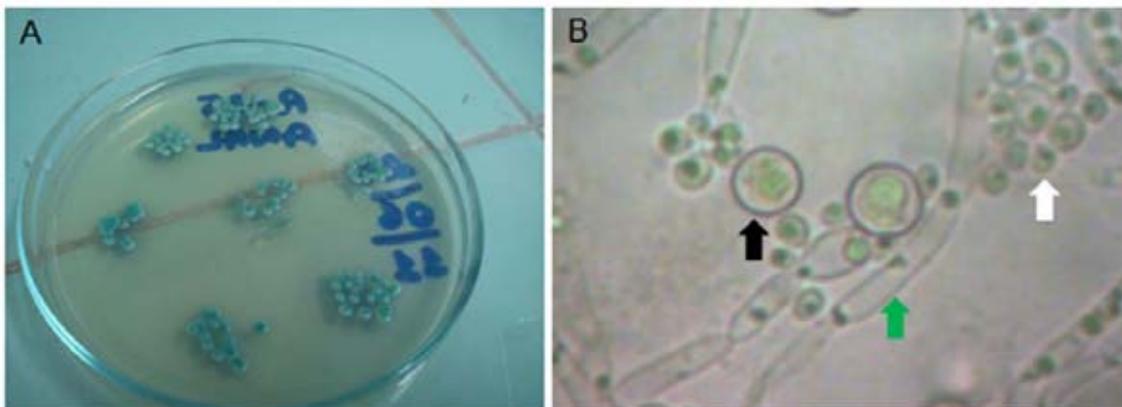
### 5.1 OBTENÇÃO DAS CEPAS DE *C. albicans* AVALIADAS NESTE ESTUDO

Para este estudo, foram selecionadas 25 cepas de *C. albicans* do banco de leveduras do Laboratório de Micologia do Hospital Giselda Trigueiro obtidas de 12 pacientes durante o período de maio de 2003 a maio de 2005, bem como 37 cepas de *C. albicans* isoladas de 10 pacientes durante o período de novembro de 2011 a agosto de 2012, totalizando 62 isolados de *C. albicans*, dos quais 32 foram obtidos de pacientes com CVVR e 30 foram obtidos de pacientes com CVV esporádica (Tabelas 1 e 2).

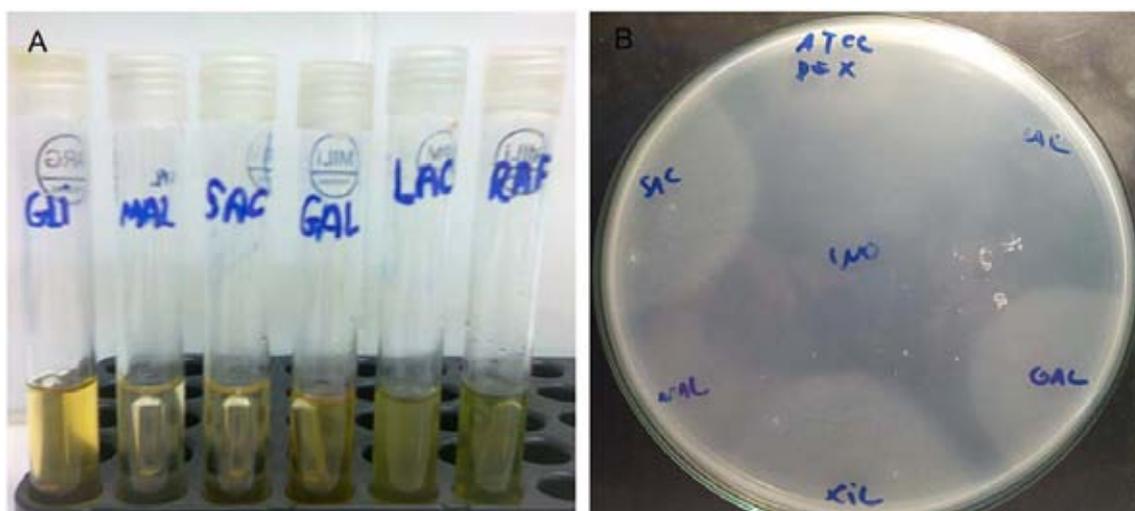
No total, foram incluídas 21 pacientes, sendo uma paciente participante dos dois períodos de estudo citados (isolados 58 1CV e 01 1CV), com média de idade de 29,6 anos ( $DP \pm 8,2$ ), as quais assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). A maioria dos isolados inclusos constituem pares (isolado vaginal e isolado anal) obtidos da mesma paciente e/ou sequências obtidas do mesmo sítio (vaginal ou anal) ao longo de coletas realizadas sequencialmente em uma mesma paciente; enquanto em um único caso os isolados vaginais foram obtidos de uma mesma paciente em períodos distintos de estudo (Isolados 58 1CV e 01 1CV; Tabelas 1 e 2).

Das 62 cepas, 36 constituem isolados vaginais e 26 constituem isolados anais, havendo 24 pares (isolado vaginal e isolado anal) obtidos simultaneamente de uma mesma paciente, nove sequências de isolados vaginais e seis sequências de isolados anais, obtidas de uma mesma paciente em diferentes períodos (semanalmente ou mensalmente).

A identificação fenotípica dos 62 isolados inclusos no estudo foi confirmada utilizando-se meio cromogênico CHROMagar Candida® (colônias verdes; Fig. 2A), bem como através das provas de microcultivo (Fig. 2B; SIDRIM, ROCHA, 2004) e, de acordo com a necessidade, pela metodologia clássica de identificação das leveduras (fermentação e assimilação de carboidratos; Fig. 3; KURTZMAN, FELL, 1998).

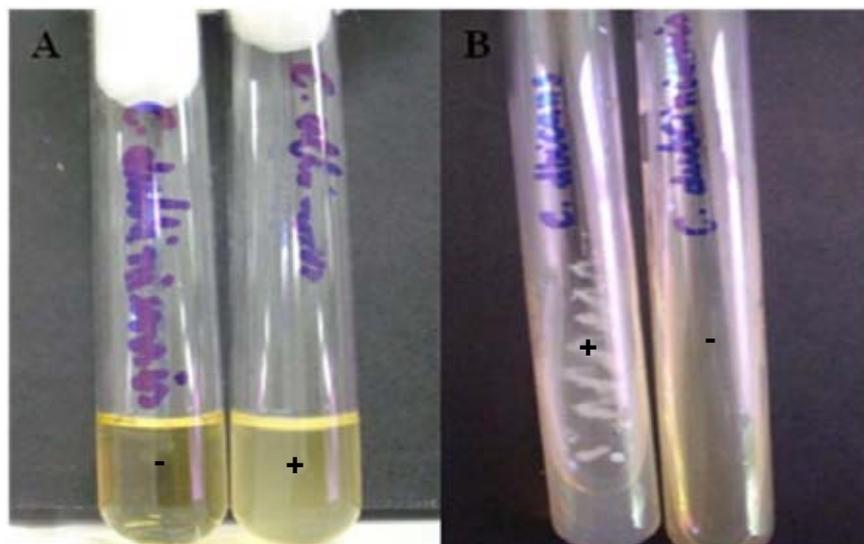


**Figura 2.** (A) Coloração verde no meio cromogênico CHROMagar Candida® após 72h de incubação, sugestiva de *Candida albicans* ou *Candida dubliniensis* (técnica dos 7 pontos). (B) Aspecto micromorfológico de *Candida albicans*/ *Candida dubliniensis* no Ágar Fubá com Tween 80 após incubação a 30°C, 72h (400 x de magnificação). A seta preta representa um clamidoconídio, a seta verde representa uma hifa verdadeira e a seta branca representa um aglomerado de blastoconídios. Fonte: Acervo pessoal.



**Figura 3.** (A) Prova de fermentação de açúcares (zimograma) de cepa de *Candida albicans*, apresentando fermentação, com produção de gás, dos açúcares dextrose, maltose, sacarose e galactose. (B) Prova de assimilação de fontes de carbono (auxanograma) de cepa de *Candida albicans*, apresentando assimilação, visualizada pela presença de halo de crescimento, dos açúcares dextrose, sacarose, maltose, xilose e galactose. Fonte: Acervo pessoal.

Com relação à triagem fenotípica, todos os 62 isolados caracterizados, pelos métodos citados anteriormente, como sugestivos de *C. albicans* ou de *C. dubliniensis*, apresentaram turvação no Caldo Sabouraud hipertônico e crescimento à temperatura de 42 °C (Fig. 4). Portanto, os mesmos foram identificados presuntivamente como *C. albicans*.



**Figura 4.** (A) Teste do caldo hipertônico, após 96h de incubação. O tubo à esquerda, sem turvação, representa uma cepa de *Candida dubliniensis* (resultado negativo), enquanto o tubo à direita representa uma cepa de *Candida albicans*, com turvação do meio SDA com 6,5% de NaCl (resultado positivo). (B) Teste de tolerância à temperatura de 42 °C após 48h de incubação. O tubo à esquerda, com crescimento em YPD, representa uma cepa de *Candida albicans* (resultado positivo), enquanto o tubo à direita representa uma cepa de *Candida dubliniensis*, com ausência de crescimento em YPD (resultado negativo). Fonte: Acervo pessoal.

**Tabela 1** – Isolados de *Candida albicans* obtidos no primeiro período de estudo, de maio de 2003 a maio de 2005, obtidos de pacientes com manifestação clínica compatível com CVV.

Paciente	Nº do isolado no banco de micro-organismos	Sítio de isolamento	Relação levedura-hospedeiro	Tipo de CVV
07	07 1CV BG	Vagina	Infecção	Recorrente
	07 1CA BG	Ânus	Colonização	
14	14 3CV BG	Vagina	Infecção	Recorrente
	14 4CV BG	Vagina	Infecção	
	14 1CA BG	Ânus	Colonização	
30	30 2CV	Vagina	Infecção	Recorrente
	30 3CV	Vagina	Infecção	
	30 6CV	Vagina	Infecção	
56	56 3CV	Vagina	Infecção	Recorrente
	56 3CA	Ânus	Colonização	
58	58 1CV	Vagina	Infecção	Recorrente
60	60 1CV	Vagina	Infecção	Recorrente
	60 1CA	Ânus	Colonização	
61	61 2CV	Vagina	Infecção	Recorrente
	61 2CA	Ânus	Colonização	
70	70 1CV	Vagina	Infecção	Recorrente
	70 1CA	Ânus	Colonização	
78	78 1CV	Vagina	Infecção	Recorrente
	78 1CA	Ânus	Colonização	
81	81 2CV	Vagina	Infecção	Recorrente
	81 3CA	Ânus	Colonização	
83	83 1CV	Vagina	Infecção	Recorrente
	83 1CA	Ânus	Colonização	
94	94 1CV	Vagina	Infecção	Recorrente
	94 4CV	Vagina	Infecção	

FONTE: Livro de registro do Laboratório de Micologia Médica e Molecular, UFRN. Nota: 1CV = 1ª coleta vaginal; 2CV = 2ª coleta vaginal; 3CV = 3ª coleta vaginal; 4CV = 4ª coleta vaginal; 6CV = 6ª coleta vaginal; 1CA = 1ª coleta anal; 2CA = 2ª coleta anal; 3CA = 3ª coleta anal; BG = Banco Giselda; LM = Laboratório de Micologia, sigla utilizada para diferenciar cepas com o mesmo código no primeiro e segundo períodos de estudo.

**Tabela 2** – Isolados de *Candida albicans* obtidos no segundo período de estudo, de novembro de 2011 a agosto de 2012, obtidos de pacientes com manifestação clínica compatível com CVV.

Paciente	Nº do isolado no banco de micro-organismos	Sítio de isolamento	Relação levedura-hospedeiro	Tipo de CVV
01	01 1CV	Vagina	Infecção	Recorrente
05	05 1CV	Vagina	Infecção	Esporádica
	05 1CA	Ânus	Colonização	
07	07 1CV LM	Vagina	Infecção	Esporádica
	07 1CA LM	Ânus	Colonização	
	07 2CV	Vagina	Infecção	
	07 2CA	Ânus	Colonização	
	07 3CV	Vagina	Infecção	
10	07 3CA	Ânus	Colonização	Esporádica
	10 1CV	Vagina	Infecção	
	10 2CV	Vagina	Infecção	
	10 2CA	Ânus	Colonização	
12	10 3CV	Vagina	Infecção	Esporádica
	10 3CA	Ânus	Colonização	
	12 1CV	Vagina	Infecção	
13	12 1CA	Ânus	Colonização	Esporádica
	12 2CV	Vagina	Infecção	
	12 2CA	Ânus	Colonização	
14	13 1CV	Vagina	Infecção	Esporádica
	13 1CA	Ânus	Colonização	
	14 1CV	Vagina	Infecção	
	14 1CA LM	Ânus	Colonização	
20	14 2CV	Vagina	Infecção	Esporádica
	14 2CA	Ânus	Colonização	
	14 3CV LM	Vagina	Infecção	
	14 3CA	Ânus	Colonização	
25	14 4CV LM	Vagina	Infecção	Esporádica
	20 1CV	Vagina	Infecção	
	20 1CA	Ânus	Colonização	
	20 4CV	Vagina	Infecção	
27	20 4CA	Ânus	Colonização	Recorrente
	25 1CV	Vagina	Infecção	
	25 1CA	Ânus	Colonização	
27	25 2CV	Vagina	Infecção	Recorrente
	25 2CA	Ânus	Colonização	
27	27 1CV	Vagina	Infecção	Recorrente
	27 1CA	Ânus	Colonização	

FONTE: Livro de registro do Laboratório de Micologia Médica e Molecular, UFRN. Nota: 1CV = 1ª coleta vaginal; 2CV = 2ª coleta vaginal; 3CV = 3ª coleta vaginal; 4CV = 4ª coleta vaginal; 1CA = 1ª coleta anal; 2CA = 2ª coleta anal; 3CA = 3ª coleta anal; BG = Banco Giselda; LM = Laboratório de Micologia, sigla utilizada para diferenciar cepas com o mesmo código no primeiro e segundo períodos de estudo.

## 5.2 AVALIAÇÃO DOS SINAIS E SINTOMAS, FATORES PREDISPOENTES E USO DE ANTIFÚNGICOS

Todas as pacientes participantes do estudo (n=21) apresentaram um ou mais sinais e sintomas de CVV, bem como um ou mais fatores predisponentes no momento em que foram incluídas no estudo, porém dados relativos a coletas subsequentes apenas foram obtidos das pacientes do segundo período de estudo (novembro de 2011 a agosto de 2012).

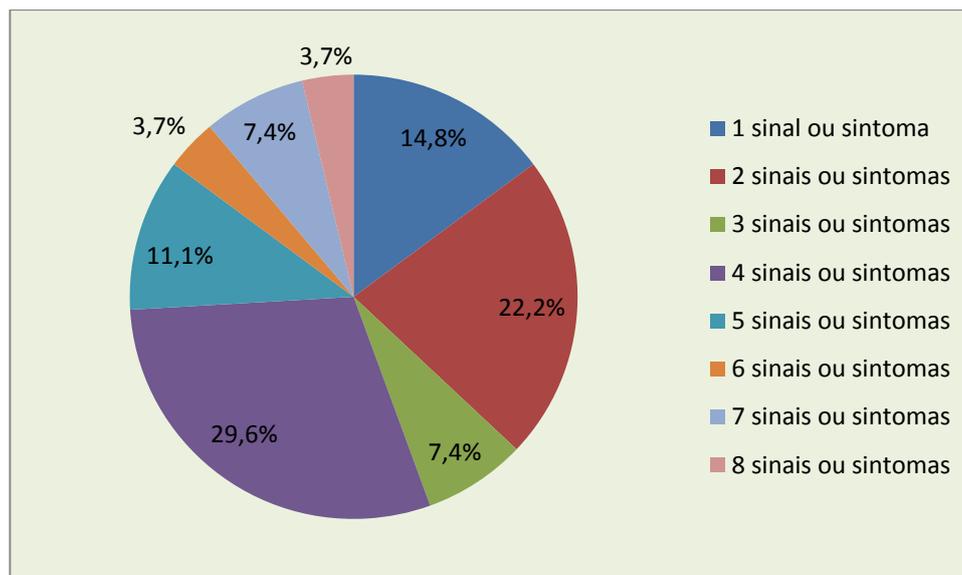
Dentre os sinais e sintomas apresentados pelas pacientes, o sinal mais prevalente foi a leucorreia, presente em 26 ocasiões (96,3%), seguido pelo prurido, sintoma presente em 19 ocasiões (70,4%; Tabela 3).

**Tabela 3** – Sinais e sintomas de CVV apresentados pelas pacientes incluídas no presente estudo

Sinal ou sintoma	Nº de ocasiões em que o sinal ou sintoma estava presente/ nº total de ocasiões observadas* (%)
Leucorréia	26/27 (96,3%)
Prurido	19/27 (70,4%)
Eritema	13/27 (48,1 %)
Dispareunia	11/26 (42,3 %)
Ardor	6/17 (35,3 %)
Odor fétido	9/27 (33,3 %)
Edema	7/27 (25,9 %)
Disúria	6/27 (22,2 %)

\* Ocasões nas quais as pacientes apresentaram cultura de secreção vaginal positiva para *Candida albicans* (n=27). FONTE: Dados clínicos obtidos através da aplicação de questionário (APÊNDICE B), armazenados no Laboratório de Micologia Médica e Molecular, UFRN.

Na maioria das situações em que foram obtidas culturas positivas de *C. albicans*, as pacientes apresentavam quatro sinais ou sintomas de CVV (n=8; 29,6%, Fig. 5).



**Figura 5.** Distribuição da quantidade de sinais e sintomas apresentados pelas pacientes do estudo quando as mesmas apresentaram cultura de secreção vaginal positiva para *Candida albicans* (27).

Verificou-se, através das fichas clínicas das pacientes participantes do segundo período de estudo, que a maioria destas apresentou remissão apenas parcial dos sinais e sintomas de CVV ao longo do tempo, sendo possível isolar *C. albicans* das culturas de secreção vaginal subsequentes, sugerindo ineficiência terapêutica e continuidade do processo infeccioso. Em um único caso (paciente 07), foi possível constatar a cura de CVV, uma vez que a paciente apresentou cultura de secreção vaginal negativa para *C. albicans* na quarta coleta (dado não mostrado). Por outro lado, houve um caso (paciente 14) em que a paciente, que até então apresentava remissão parcial dos sinais e sintomas de CVV (segunda e terceira coletas), voltou a apresentar todos os sinais e sintomas característicos de CVV na quarta coleta das amostras clínicas. Os únicos isolados vaginais sequenciais obtidos de paciente com CVVR (paciente 25) no segundo período de estudo correspondem a episódios de CVV distintos.

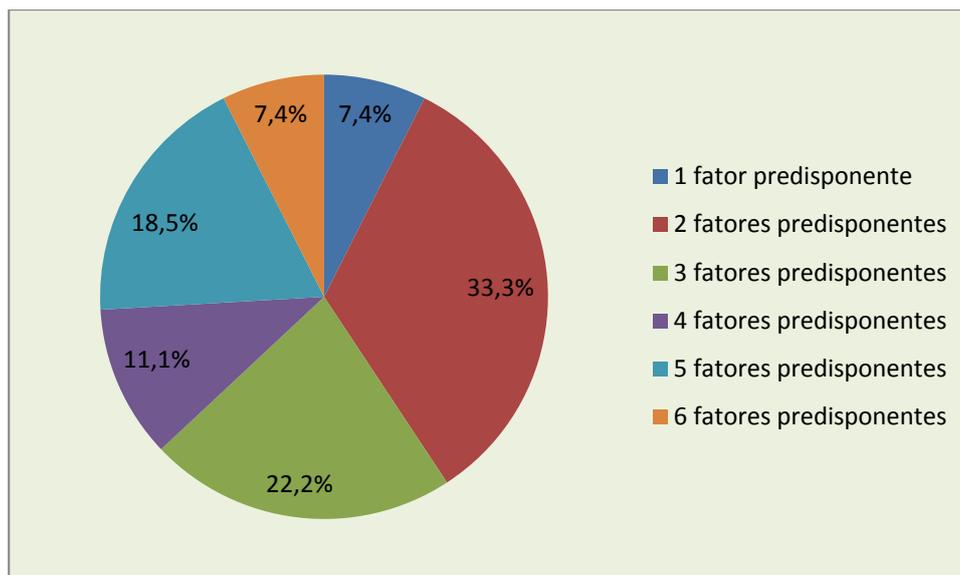
Em todas as ocasiões observadas (n=26; 100%), as pacientes apresentavam vida sexual ativa, sendo este o fator predisponente mais prevalente. A gravidez foi o segundo fator predisponente mais prevalente (n=16; 59,3%), seguida do uso de roupas íntimas de nylon (n=14; 51,9%; Tabela 4).

**Tabela 4** – Fatores predisponentes de CVV apresentados pelas pacientes inclusas no presente estudo

<b>Fator predisponente</b>	<b>Nº de ocasiões em que o fator estava presente/ nº total de ocasiões observadas* (%)</b>
Vida sexual ativa	26/26 (100%)
Gravidez	16/27 (59,3%)
Uso de roupas íntimas de nylon	14/27 (51,9 %)
Uso de calças apertadas	11/27 (40,7 %)
Alergia	7/27 (25,9 %)
Uso de anticoncepcional	5/27 (18,5 %)
Uso de absorvente interno	5/27 (18,5 %)
Diabetes	4/27 (14,8 %)
Uso de antibacteriano (últimos 30 dias)	1/27 (3,7 %)
Uso de DIU	1/27 (3,7 %)
Uso de imunossupressores	0
Imunossupressão	0
Asma	0
Traumatismo no canal vaginal	0
Uso de corticoide	0
Reposição hormonal	0

\* Ocasões nas quais as pacientes apresentaram cultura de secreção vaginal positiva para *Candida albicans* (n=27). FONTE: Dados clínicos obtidos através da aplicação de questionário (APÊNDICE B), armazenados no Laboratório de Micologia Médica e Molecular, UFRN.

Na maioria das situações em que foram obtidas culturas positivas de *C. albicans*, as pacientes apresentavam apenas dois fatores predisponentes de CVV (n=9; 33,3%; Fig. 6).



**Figura 6.** Distribuição da quantidade de fatores predisponentes apresentados pelas pacientes do estudo quando as mesmas apresentaram cultura de secreção vaginal positiva para *Candida albicans* (27).

Quanto ao uso de antifúngicos, sabe-se que foi instituído tratamento de CVV das pacientes participantes do primeiro período de estudo durante consulta médica, no momento da obtenção das primeiras amostras clínicas (secreção vaginal e anal), porém os antifúngicos utilizados não foram especificados.

Verificou-se, através das fichas clínicas das pacientes participantes do segundo período de estudo, que algumas delas haviam feito uso de antifúngicos há pouco tempo previamente ao momento da obtenção das amostras clínicas (secreção vaginal e anal), enquanto que outras se encontravam em uso de antifúngicos quando as amostras clínicas foram obtidas (Tabela 5).

**Tabela 5** – Uso de antifúngico pelas pacientes inclusas no estudo com manifestação clínica compatível com CVV.

Paciente	Momento de obtenção das amostras clínicas	Situação em relação ao período de utilização de antifúngicos	Antifúngico utilizado
01	1ª coleta	Há menos de 10 dias	Fluconazol
07	2ª coleta	Há menos de 10 dias	Clotrimazol
	3ª coleta	Em uso	Miconazol
10	2ª coleta	Há menos de um mês	Nistatina
12	2ª coleta	Há menos de um mês	Nistatina
14	1ª coleta	Há menos de um mês	Nistatina
	2ª coleta	Há menos de um mês	Nistatina
	3ª coleta	Em uso	Nistatina
	4ª coleta	Em uso	Nistatina
20	1ª coleta	Há menos de 10 dias	Miconazol
25	1ª coleta	Há menos de um mês	Fluconazol
	2ª coleta	Em uso	Fluconazol

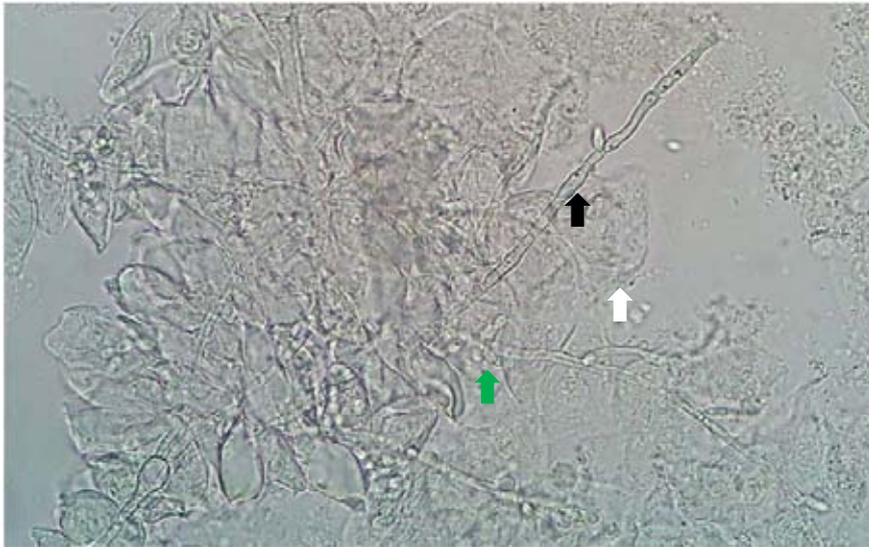
FONTE: Dados clínicos obtidos através da aplicação de questionário (APÊNDICE B), armazenados no Laboratório de Micologia Médica e Molecular, UFRN.

Assim, observou-se o uso de quatro antifúngicos: miconazol e clotrimazol, pertencentes à classe dos imidazólicos; nistatina, pertencente à classe dos poliênicos e fluconazol, pertencente à classe dos triazólicos, sendo os três primeiros de aplicação tópica, na forma farmacêutica de creme vaginal; e o último de aplicação sistêmica, na forma farmacêutica de comprimido.

### 5.3 EXAME DIRETO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS (SECREÇÃO VAGINAL E SECREÇÃO ANAL)

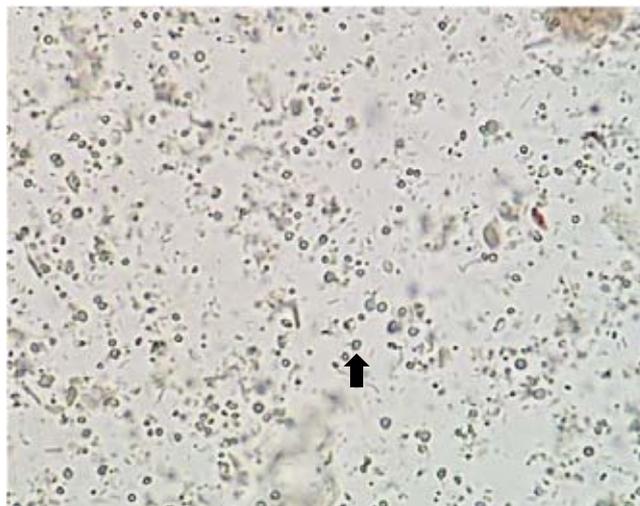
O exame direto foi realizado apenas a partir das amostras clínicas (secreção vaginal e secreção anal) coletadas das pacientes do segundo período de estudo (novembro de 2011 a agosto de 2012).

Através do exame direto das amostras clínicas (secreção vaginal e secreção anal), foi possível verificar a presença de estruturas fúngicas, correspondentes às morfologias esperadas para *C. albicans* (blastocóndio, pseudo-hifa e hifa verdadeira; Fig. 7), bem como de leucócitos, células de defesa do sistema imunológico do hospedeiro, indicando a presença de resposta inflamatória.



**Figura 7.** Exame direto de amostra clínica de secreção vaginal, realizado a fresco entre lâmina e lamínula e observado sob microscopia óptica (400 x de magnificação). A seta preta representa uma estrutura de filamentação, a seta verde representa blastoconídios em brotamento e a seta branca representa uma célula epitelial da mucosa vaginal. Fonte: Acervo pessoal.

Em alguns casos, apenas foi possível observar células leveduriformes (Fig. 8), ou seja, células com morfologia típica de leveduras, porém sem brotamentos característicos da sua reprodução assexuada que confirmassem a sua identificação como blastoconídios.



**Figura 8.** Exame direto de amostra clínica de secreção anal realizado a fresco entre lâmina e lamínula e observado sob microscopia óptica (400 x de magnificação), revelando a presença de células leveduriformes (seta). Fonte: Acervo pessoal.

Verificou-se 100% (n=19) de concordância entre o exame direto e a cultura das secreções vaginais, onde sempre que houve crescimento de *C. albicans*, o exame direto revelou-se positivo, evidenciado pela presença de estruturas fúngicas (blastoconídios, pseudo-hifas ou hifas verdadeiras) ou de células leveduriformes. Com relação às secreções anais, houve 93,7% (n=15) de concordância entre o exame direto e a cultura, havendo um caso (6,3%) em que o exame direto foi negativo para fungos e a cultura foi positiva para *C. albicans*.

Constatou-se a presença de células leveduriformes no exame direto de uma secreção vaginal (5,3%) e seis secreções anais (37,5%), das quais *C. albicans* foi isolada através da cultura, indicando que estas células, de fato, se tratavam de leveduras. A estrutura fúngica mais prevalente nas secreções vaginais e anais foi o blastoconídio apresentando brotamentos, presente em 18 amostras vaginais (94,7%) e nove das amostras anais (56,3%; Tabela 6).

Pseudo-hifas e hifas verdadeiras foram evidenciadas na maioria das amostras vaginais, estando presentes em 14 ocasiões (73,7%), enquanto leucócitos foram encontrados em todas as amostras de secreção vaginal. Ao contrário do que era esperado, foi possível constatar a presença de pseudo-hifas em uma das amostras (6,3%) e de hifas verdadeiras em duas amostras anais (12,5%), bem como a presença de leucócitos em uma amostra anal que também continha hifa verdadeira (6,7%; Tabela 6).

**Tabela 6** – Estruturas evidenciadas ao exame direto das amostras clínicas (secreção vaginal e secreção anal) coletadas entre novembro de 2011 e agosto de 2012

<b>Estrutura</b>	<b>Secreções vaginais [n/n total (%)]</b>	<b>Secreções anais [n/n total (%)]</b>
<b>Células leveduriformes</b>	1/19 (5,3%)	6/16 (37,5%)
<b>Blastoconídios</b>	18/19 (94,7%)	9/16 (56,3%)
<b>Pseudo-hifas</b>	14/19 (73,7%)	1/16 (6,3%)
<b>Hifas verdadeiras</b>	14/19 (73,7%)	2/16 (12,5%)
<b>Leucócitos</b>	17/17 (100%)	1/15 (6,7%)

FONTE: Livro de registro do Laboratório de Micologia Médica e Molecular, UFRN.

#### 5.4 CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA (UFC) PRESENTES NAS AMOSTRAS CLÍNICAS (SECREÇÃO VAGINAL E SECREÇÃO ANAL)

Com o objetivo de avaliar se a carga fúngica influenciaria no sucesso da colonização/ infecção por *C. albicans*, realizamos a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) presentes na suspensão das amostras (secreções vaginal e anal) em solução salina (NaCl 0,9%), a qual foi inoculada na superfície do ágar Sabouraud-dextrose com cloranfenicol e rosa de bengala através da técnica de distensão, incubando-se a 30°C por 96h (Fig. 9). O resultado foi expresso em UFC/mL de suspensão.

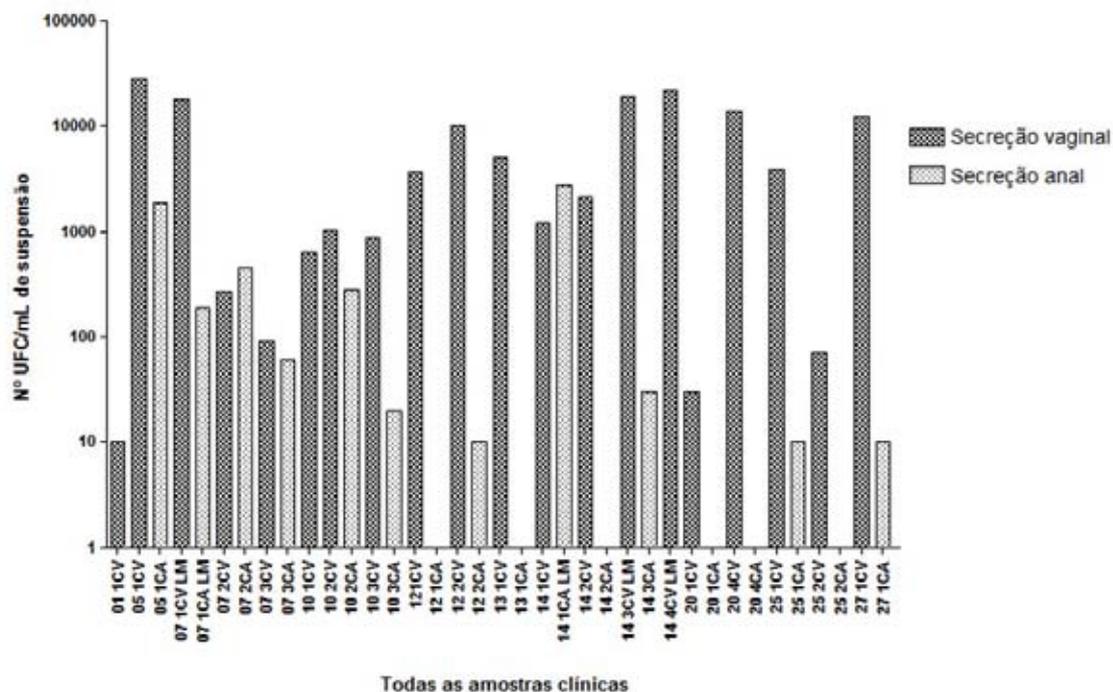
A contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) foi realizada apenas das amostras clínicas coletadas no segundo período de estudo (novembro de 2011 a agosto de 2012).



**Figura 9.** Placa de SDA com cloranfenicol e rosa de bengala inoculada com suspensão de secreção anal, após incubação de 96h a 30°C. Fonte: Acervo pessoal.

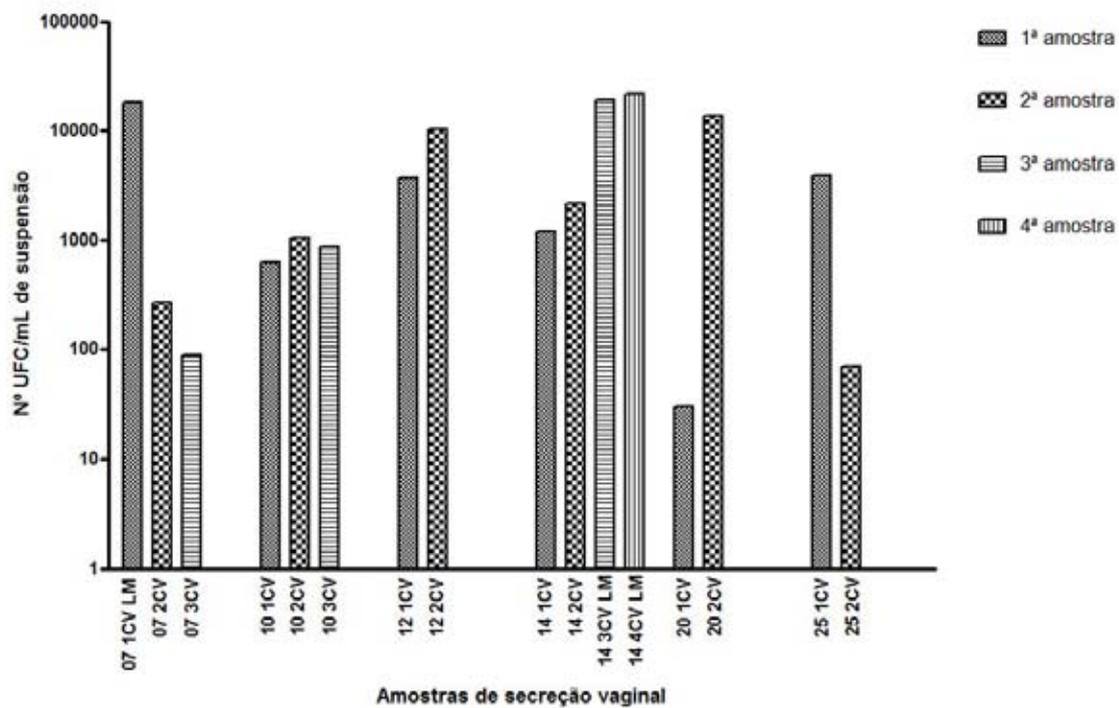
As amostras de secreção vaginal apresentaram uma média de 7139 (DP±8763) UFC/mL, significativamente superior ( $p < 0,0001$ ) à média de 331 (DP±762) UFC/mL apresentada pelas amostras de secreção anal.

Contudo, observando-se apenas as amostras vaginais, verifica-se uma ampla distribuição dos valores de UFC, variando de apenas 10 UFC/mL até 28000 UFC/mL, variação também encontrada nas amostras anais (embora com menor amplitude), cujos valores variaram de 0 a 2720 UFC/mL (Fig. 10).



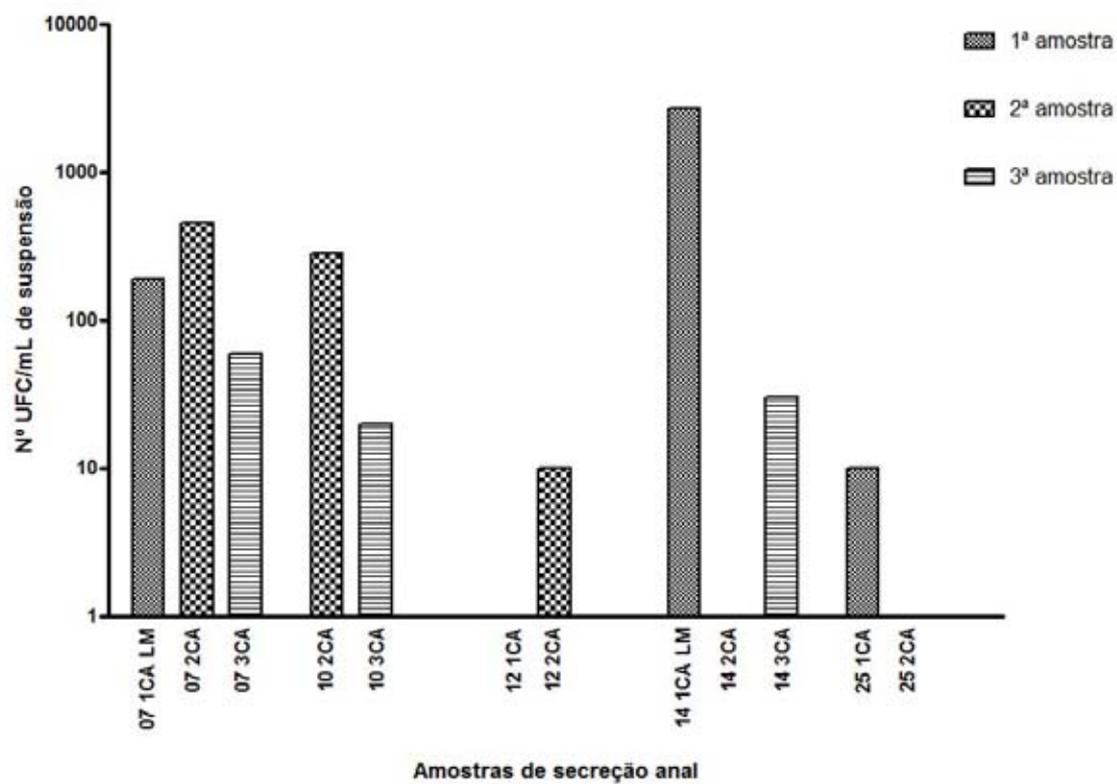
**Figura 10.** Número de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Candida albicans*/mL de suspensão das amostras clínicas (secreções vaginais e anais) obtidas de pacientes com sintomatologia compatível com CVV, determinadas após 96 h de incubação em SDA a 30 °C. Média vaginal  $\pm$  DP = 7139  $\pm$  8763; média anal  $\pm$  DP = 331  $\pm$  762.  $p < 0,0001$  (teste t de Mann-Whitney comparando-se as amostras vaginais com as amostras anais quanto ao n° de UFC).

Avaliando-se a contagem de UFC ao longo das coletas vaginais obtidas sequencialmente de uma mesma paciente, verifica-se que nem sempre há uma tendência à redução do número de colônias, mesmo após tratamento das pacientes com antifúngicos e remissão parcial dos sinais e sintomas (Fig. 11).



**Figura 11.** Observação do número de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Candida albicans*/mL de suspensão de amostras de secreções vaginais sequenciais obtidas de pacientes com sintomatologia compatível com CVV, determinadas após 96 h de incubação em SDA a 30 °C.

Em se tratando da contagem de UFC ao longo das coletas anais obtidas sequencialmente de uma mesma paciente, percebe-se uma tendência à redução no número de UFC ao longo do tempo (Fig. 12).

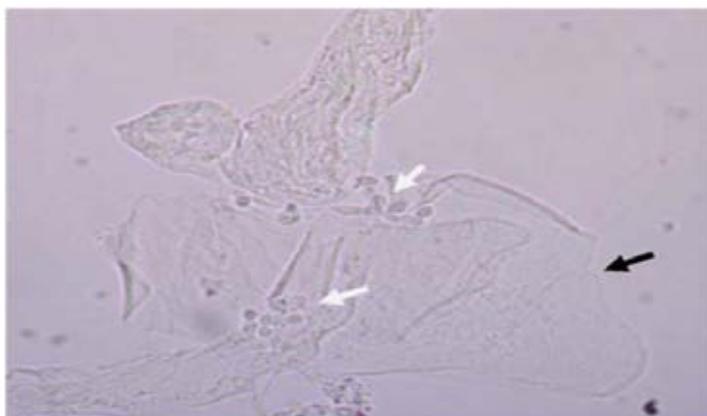


**Figura 12.** Observação do número de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Candida albicans*/mL de suspensão de amostras de secreções anais sequenciais obtidas de pacientes com sintomatologia compatível com CVV, determinadas após 96 h de incubação em SDA a 30 °C.

## 5.5 ANÁLISE FENOTÍPICA DE *C. albicans* QUANTO AOS DIFERENTES FATORES DE VIRULÊNCIA

### 5.5.1 Capacidade de aderência de *C. albicans*

Para a avaliação da capacidade de aderência de *C. albicans*, células de levedura foram colocadas em contato com células epiteliais bucais humanas (CEBH) numa proporção de 10:1 (células de *C. albicans* X CEBH) por um período de 1 hora a 37 °C (200 rpm). As células foram fixadas em solução de formaldeído a 10% em PBS e posteriormente foi determinado o número de células de *C. albicans* aderidas em 150 CEBH, através de microscopia óptica (400 x de magnificação; Fig. 13).

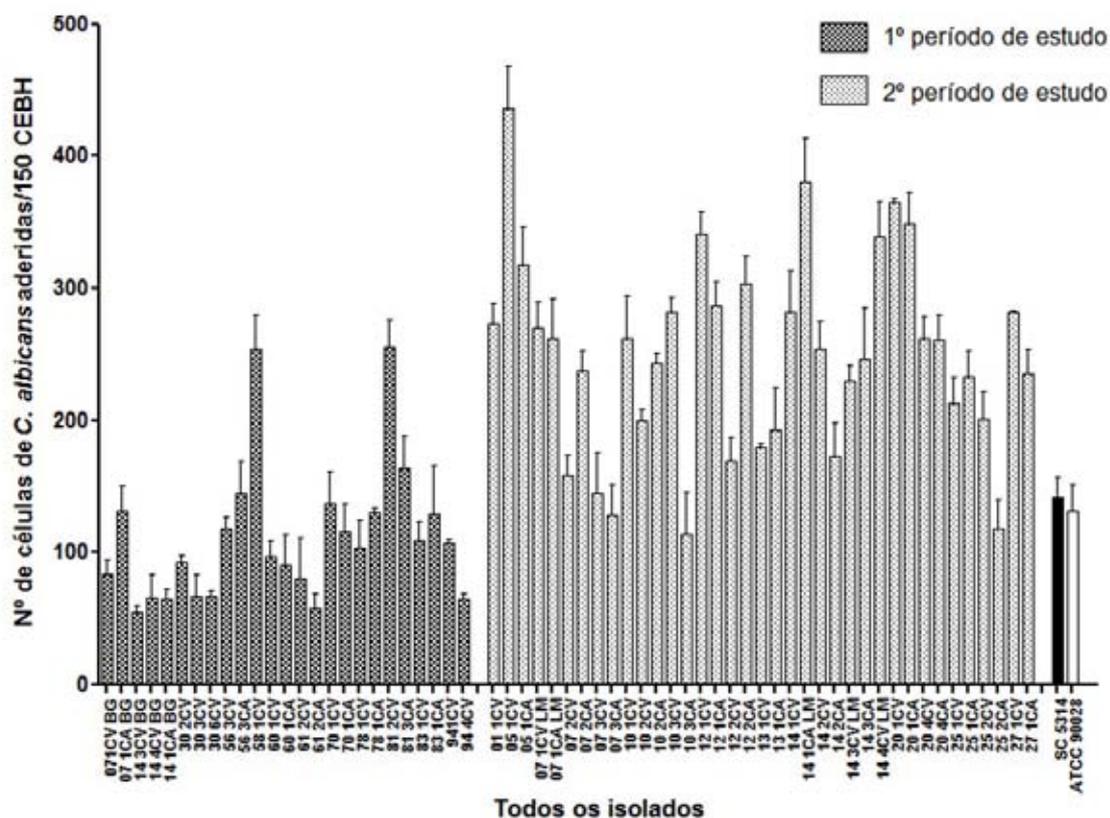


**Figura 13.** Aderência de *Candida albicans* a CEBH após incubação de 1h, 37 °C, 200 rpm. A seta preta representa a célula epitelial bucal humana (CEBH), enquanto que as brancas, os blastoconídios aderidos à mesma. Microscopia óptica (400 x de magnificação).

Os 62 isolados avaliados apresentaram uma média de 194 células de *C. albicans*/150CEBH, DP  $\pm$  95. Houve grande variabilidade na capacidade de aderência dos isolados em estudo, com amplitude de 55 células de *C. albicans*/150 CEBH a 436 células de *C. albicans*/ 150 CEBH (Fig. 14).

Em relação às cepas de referência SC5314 e ATCC 90028, as quais apresentaram, respectivamente, capacidade de aderência de 142 e 132 células de *C. albicans*/150 CEBH, a maioria dos isolados pertencentes ao primeiro período de estudo apresentou menor capacidade de aderência, enquanto o

contrário ocorreu com os isolados pertencentes ao segundo período de estudo (Fig. 14).

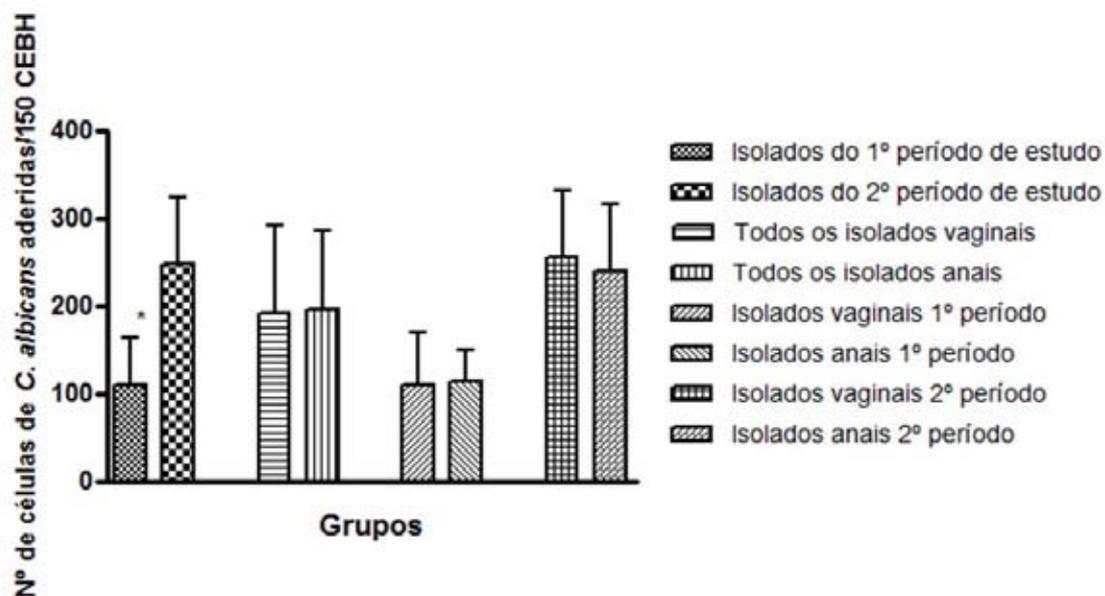


**Figura 14.** Aderência dos isolados de *Candida albicans* incluídos no estudo às CE BH após período de incubação de 1 h a 37 °C, 200 rpm. Média total  $\pm$  DP = 194  $\pm$  95. Cada barra representa a média  $\pm$  DP da triplicata obtida para cada isolado. T = Desvio padrão.

Os isolados obtidos durante o primeiro período de estudo apresentaram média de 111 células de *C. albicans*/150CEBH (DP  $\pm$  53); enquanto que os isolados obtidos no segundo período de estudo apresentaram média de 249 (DP  $\pm$  75), havendo diferença estatística entre os dois grupos mencionados ( $p < 0,0001$ ), indicando que os isolados de *C. albicans* obtidos recentemente apresentaram uma capacidade de aderência bastante superior à apresentada pelos isolados estocados em banco de micro-organismos (Fig. 15).

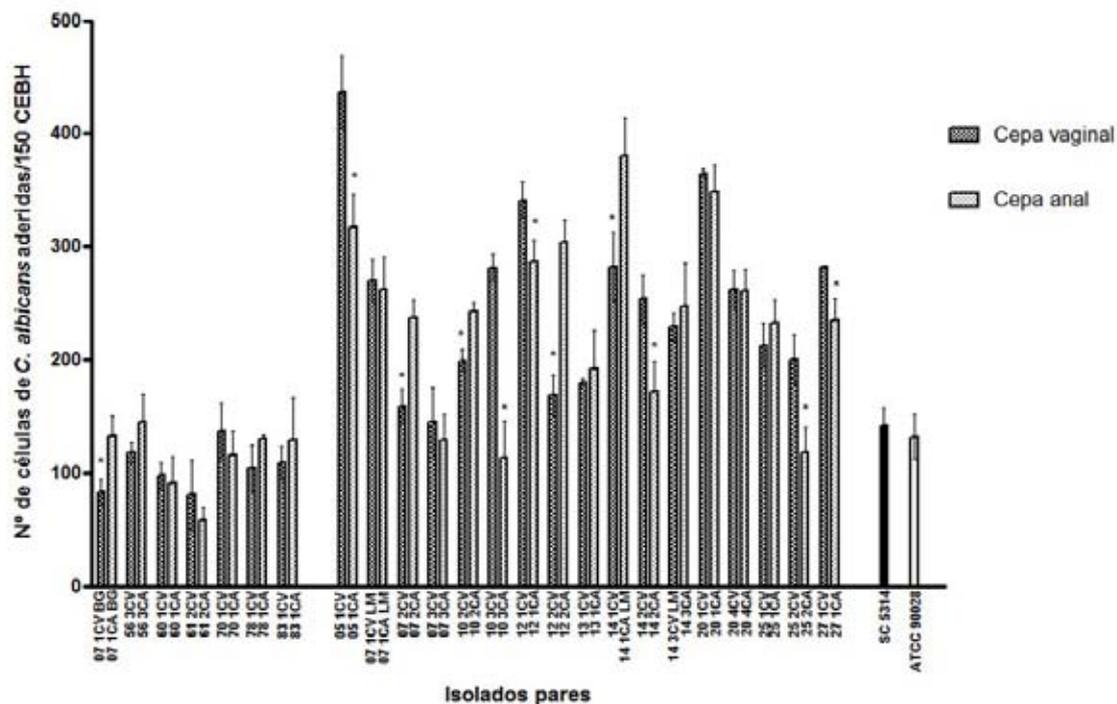
Os 36 isolados obtidos da região vaginal apresentaram uma média de 192 células de *C. albicans*/150CEBH (DP  $\pm$  101), enquanto os 26 isolados obtidos da região anal apresentaram uma média de 197 células de *C. albicans*/150 CE BH (DP  $\pm$  89), não havendo diferença estatisticamente

significativa na capacidade de aderência entre esses grupos (isolados vaginais infectantes e isolados anais colonizantes;  $p=0,76$ ; Fig. 15).



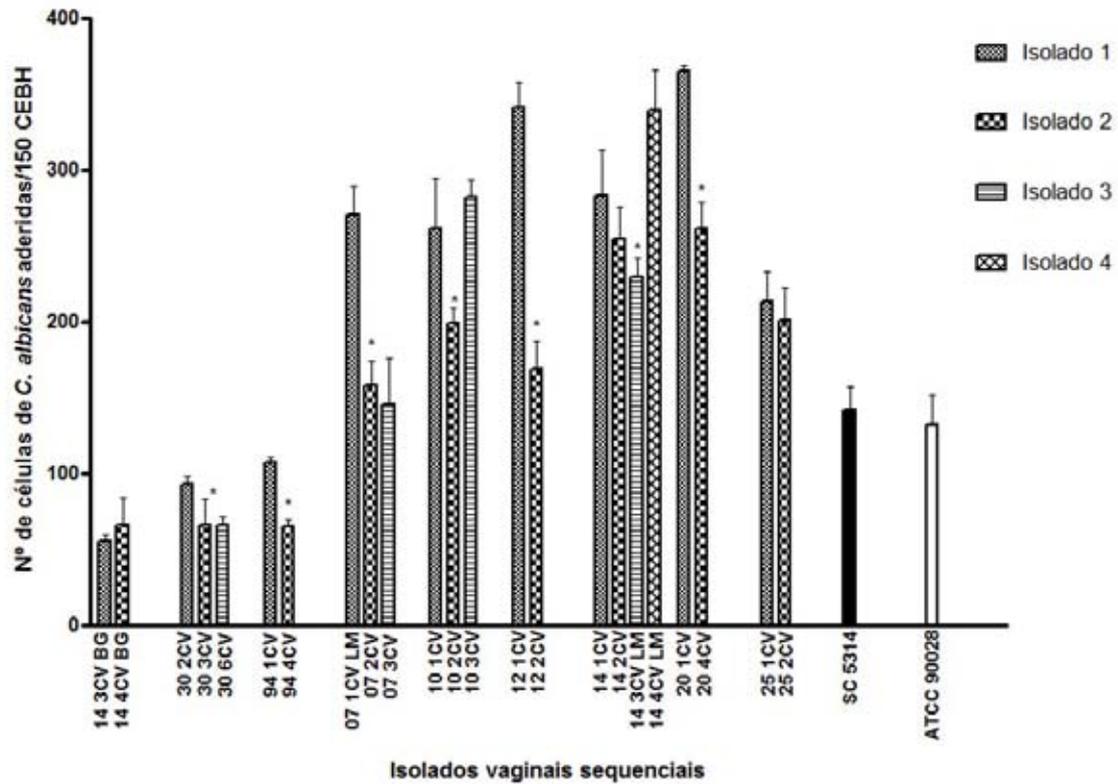
**Figura 15.** Comparação da capacidade de aderência às CEBH apresentada pelos isolados de *Candida albicans* entre diferentes grupos, classificados de acordo com o período de estudo e o sítio de isolamento. Cada barra representa a média  $\pm$  DP dos resultados obtidos para todos os isolados de cada grupo. T = Desvio padrão. \* Teste de Mann-Whitney comparando-se os isolados do primeiro período de estudo com os isolados do segundo período de estudo;  $p < 0,05$ .

Comparando-se os isolados pares (cepa vaginal e cepa anal) recuperados de uma mesma paciente em uma mesma coleta, isoladamente, não se observa tendência a uma maior capacidade de aderência por parte dos isolados vaginais ou anais (Fig. 16).

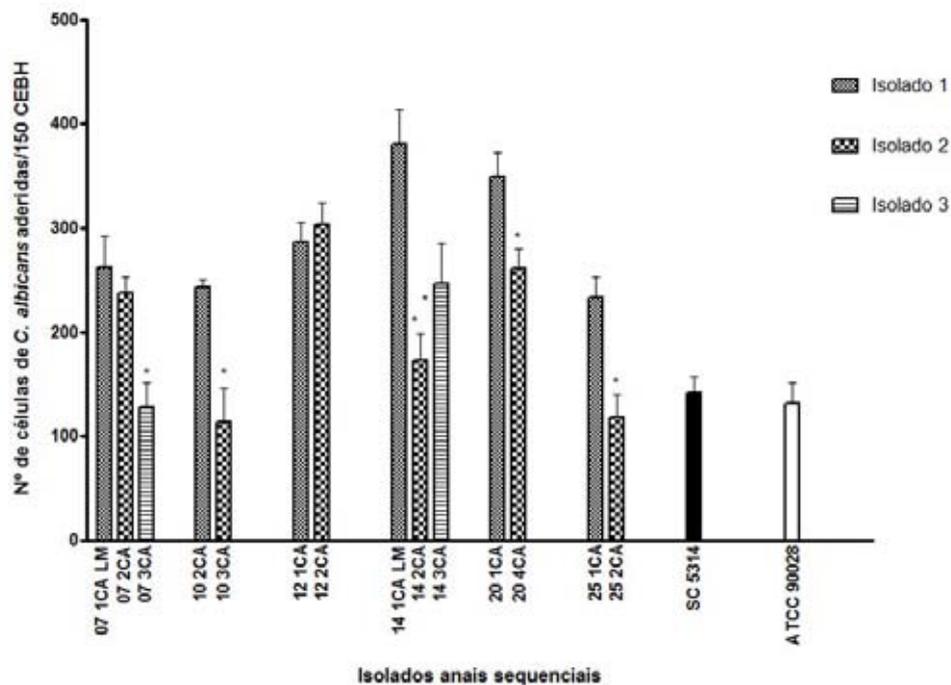


**Figura 16.** Capacidade de aderência dos pares (cepa vaginal e cepa anal) de isolados de *Candida albicans* às CEBH após período de incubação de 1 h a 37 C°, 200 rpm. Cada barra representa a média  $\pm$  DP da triplicata obtida para cada isolado. T = Desvio padrão. \* Teste t de Student comparando-se os isolados vaginais com os isolados anais correspondentes;  $p < 0,05$ .

Com relação aos isolados vaginais e anais obtidos sequencialmente, observou-se que houve uma tendência à diminuição da capacidade de aderência ao longo do tempo (Fig. 17 e Fig. 18).



**Figura 17.** Observação do comportamento da capacidade de aderência às CEBH em isolados vaginais sequenciais de *Candida albicans* após período de incubação de 1 h a 37 C°, 200 rpm. Cada barra representa a média  $\pm$  DP da triplicata obtida para cada isolado. T = Desvio padrão. \* Teste t de Student comparando-se os isolados vaginais de cada paciente entre si;  $p < 0,05$ .



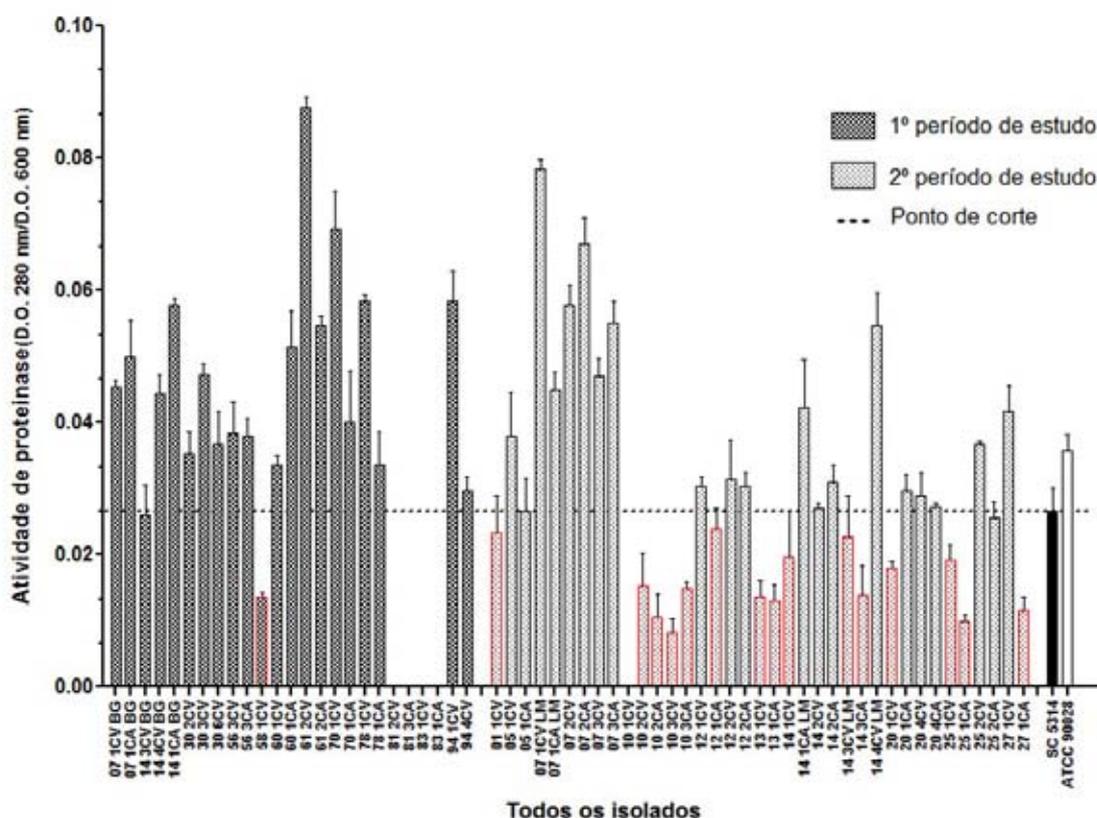
**Figura 18.** Observação do comportamento da capacidade de aderência às CEBH em isolados anais sequenciais de *Candida albicans* após período de incubação de 1 h a 37 C°, 200 rpm. Cada barra representa a média  $\pm$  DP da triplicata obtida para cada isolado. T = Desvio padrão. \* Teste t de Student comparando-se os isolados anais de cada paciente entre si;  $p < 0,05$ .

### 5.5.2. Produção de proteinases aspárticas secretadas (Saps) de *C. albicans*

A determinação da atividade proteolítica foi realizada a partir do crescimento das leveduras em YCB+BSA (D.O. 600nm) para indução da produção de proteinase aspártica secretada, sendo quantificada em função dos produtos solúveis oriundos da degradação da albumina (D.O. 280nm) por proteinases presentes no sobrenadante do meio de cultura, produzidas pelas diferentes cepas de *C. albicans*.

Dos 62 isolados, 41 (66%) apresentaram atividade de proteinase, com média de 0,044 (DP  $\pm$  0,015), variando de 0,026 a 0,088; enquanto 21 (34%) isolados foram considerados não produtores da enzima proteinase, uma vez que apresentaram valores abaixo do ponto de corte (0,025; Fig. 19).

Dentre os isolados que produziram proteinase, a maioria apresentou atividade de proteinase maior ou igual em relação às cepas de referência SC5314 e ATCC 90028, as quais apresentaram, respectivamente, atividade de proteinase de 0,03 e 0,04 (Fig. 19).

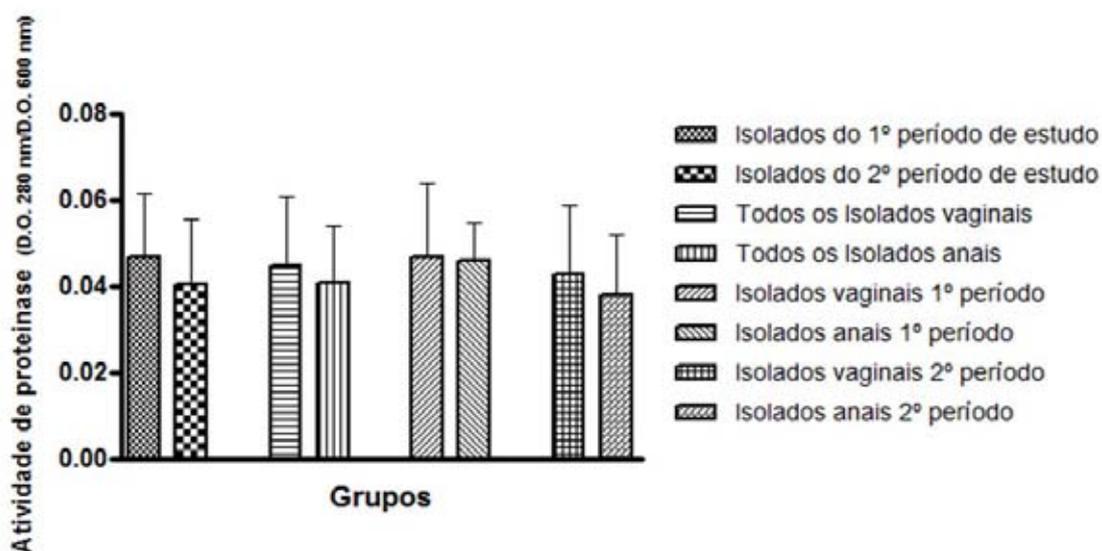


**Figura 19.** Atividade de proteinase dos isolados de *Candida albicans* incluídos no estudo após período de incubação em BSA por 1 h, pH 3,8, a 37 °C. Média total  $\pm$  DP = 0,044  $\pm$  0,015. Cada barra representa a média  $\pm$  DP da triplicata obtida para cada isolado. T = Desvio padrão. As barras vermelhas correspondem a isolados com atividade de proteinase abaixo do ponto de corte.

Os isolados obtidos durante o primeiro período de estudo que produziram proteinase (20) apresentaram média de 0,047 (DP  $\pm$  0,02); já os isolados obtidos no segundo período de estudo que produziram proteinase (21) apresentaram média de 0,041 (DP  $\pm$  0,02), não havendo diferença estatística entre os dois grupos mencionados ( $p=0,10$ ; Fig. 20).

Considerando os 21 isolados não produtores de proteinase, cinco dos mesmos pertenciam ao primeiro período de estudo, perfazendo 20% dos isolados desse grupo, enquanto 16 pertenciam ao segundo período de estudo, correspondendo a 43% dos isolados desse grupo, o que também não representa diferença estatisticamente significativa ( $p=0,06$ ).

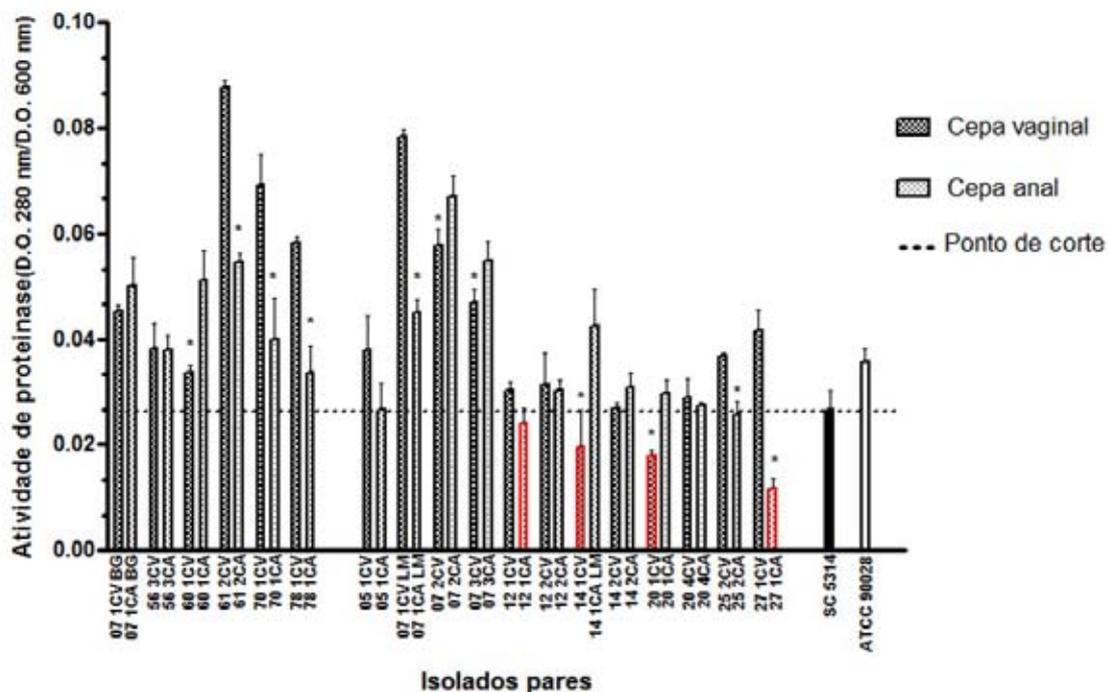
A média da atividade de proteinase dos isolados vaginais produtores desta enzima (24) foi de 0,045 (DP  $\pm$  0,02), enquanto a média dos isolados anais produtores desta enzima (17) foi de 0,041 (DP  $\pm$  0,01), não havendo diferença estatisticamente significativa entre isolados vaginais infectantes e anais colonizantes ( $p = 0,54$ ), quanto a este atributo de virulência (Fig. 20).



**Figura 20.** Comparação da atividade de proteinase apresentada pelos isolados de *Candida albicans* entre diferentes grupos, classificados de acordo com o período de estudo e o sítio de isolamento. Cada barra representa a média  $\pm$  DP dos resultados obtidos para todos os isolados de cada grupo. T = Desvio padrão.

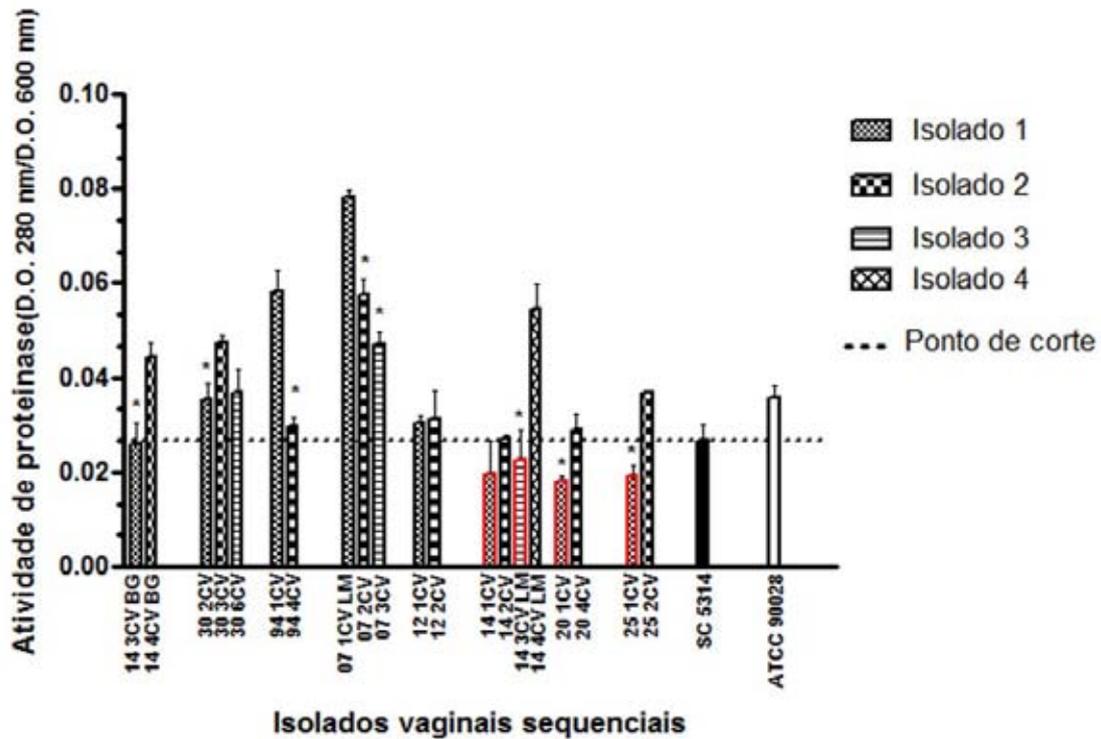
Comparando-se os valores da atividade de proteinase obtidos pelos isolados pares (cepa vaginal e cepa anal) recuperados de uma mesma paciente em uma mesma coleta, isoladamente, não se observa tendência a

uma maior produção de proteinase por parte dos isolados vaginais ou anais (Fig. 21).

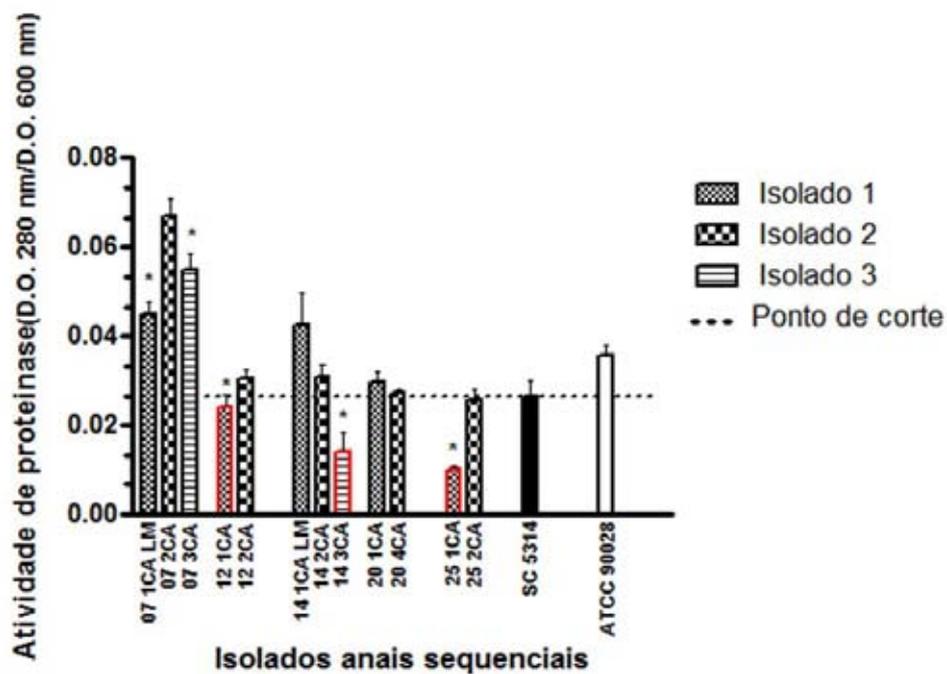


**Figura 21.** Atividade de proteinase dos pares (cepa vaginal e cepa anal) de isolados de *Candida albicans* após período de incubação em BSA por 1 h, pH 3,8, a 37 C°. Cada barra representa a média  $\pm$  DP da triplicata obtida para cada isolado. T = Desvio padrão. \* Teste t de Student comparando-se os isolados vaginais com os isolados anais correspondentes;  $p < 0,05$ .

Na medida em que se analisam os isolados vaginais e anais ao longo do tempo, obtidos sequencialmente de uma mesma paciente, verifica-se uma discreta tendência ao aumento da atividade de proteinase, embora os isolados anais sequenciais tenham apresentado um comportamento divergente daquele encontrado para os isolados vaginais sequenciais correspondentes (Fig. 22 e Fig. 23).



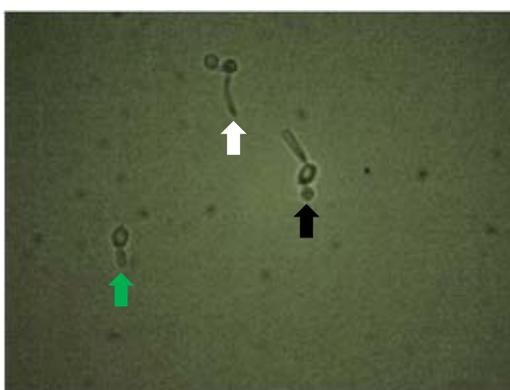
**Figura 22.** Observação do comportamento da atividade de proteinase em isolados vaginais sequenciais de *Candida albicans* após período de incubação em BSA por 1 h, pH 3,8, a 37 C°. Cada barra representa a média  $\pm$  DP da triplicata obtida para cada isolado. T = Desvio padrão. \* Teste t de Student comparando-se os isolados vaginais de cada paciente entre si;  $p < 0,05$ .



**Figura 23.** Observação do comportamento da atividade de proteinase em isolados anais sequenciais de *Candida albicans* após período de incubação em BSA por 1 h, pH 3,8, a 37 C°. Cada barra representa a média  $\pm$  DP da triplicata obtida para cada isolado. T = Desvio padrão. \* Teste t de Student comparando-se os isolados anais de cada paciente entre si;  $p < 0,05$ .

### 5.5.3 Morfogênese de *C. albicans* em meio líquido

No ensaio da morfogênese, para indução da formação de hifa em meio líquido, incubou-se a levedura em soro fetal bovino a 20% em YPD a 37°C com rotação de 200 rpm, avaliando-se a capacidade de filamentação após uma hora e três horas de incubação, obtendo-se a porcentagem de formação de tubos germinativos e o índice morfológico (IM), respectivamente, nos dois diferentes intervalos de tempo. Para tanto, foram observadas 100 células de cada amostra em microscopia óptica (Fig. 24).



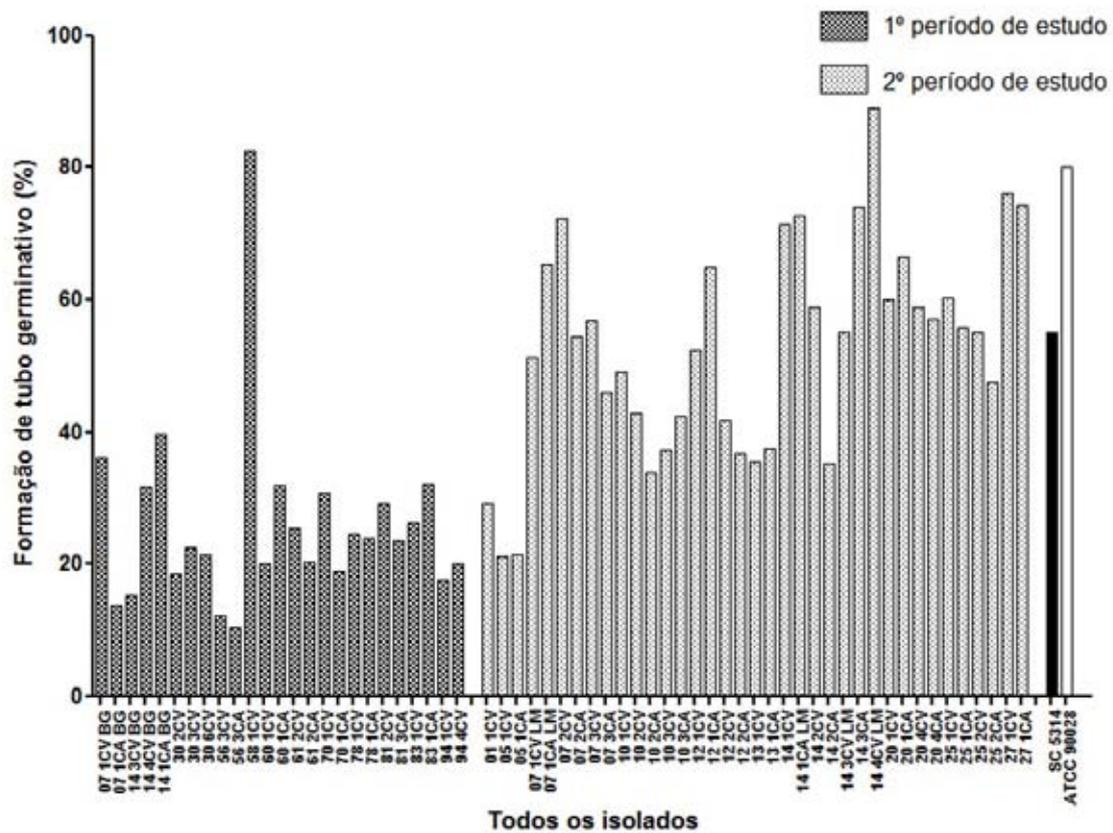
**Figura 24.** Morfogênese (transição levedura-hifa) de *Candida albicans* após incubação de 3h, 37 °C, 200 rpm. Seta preta = célula de levedura com IM 1; seta verde = célula com IM 2; seta branca = célula (tubo germinativo) com IM 4. Microscopia óptica (400 X de magnificação).

Todos os 62 isolados avaliados exibiram algum grau de filamentação (evaginação lateral) após uma hora e três horas de estímulo, com média de 42,1% (DP  $\pm$  20,2) de formação de tubo germinativo após uma hora de incubação e média de 3,05 (DP  $\pm$  0,53) para o IM obtido após três horas de incubação.

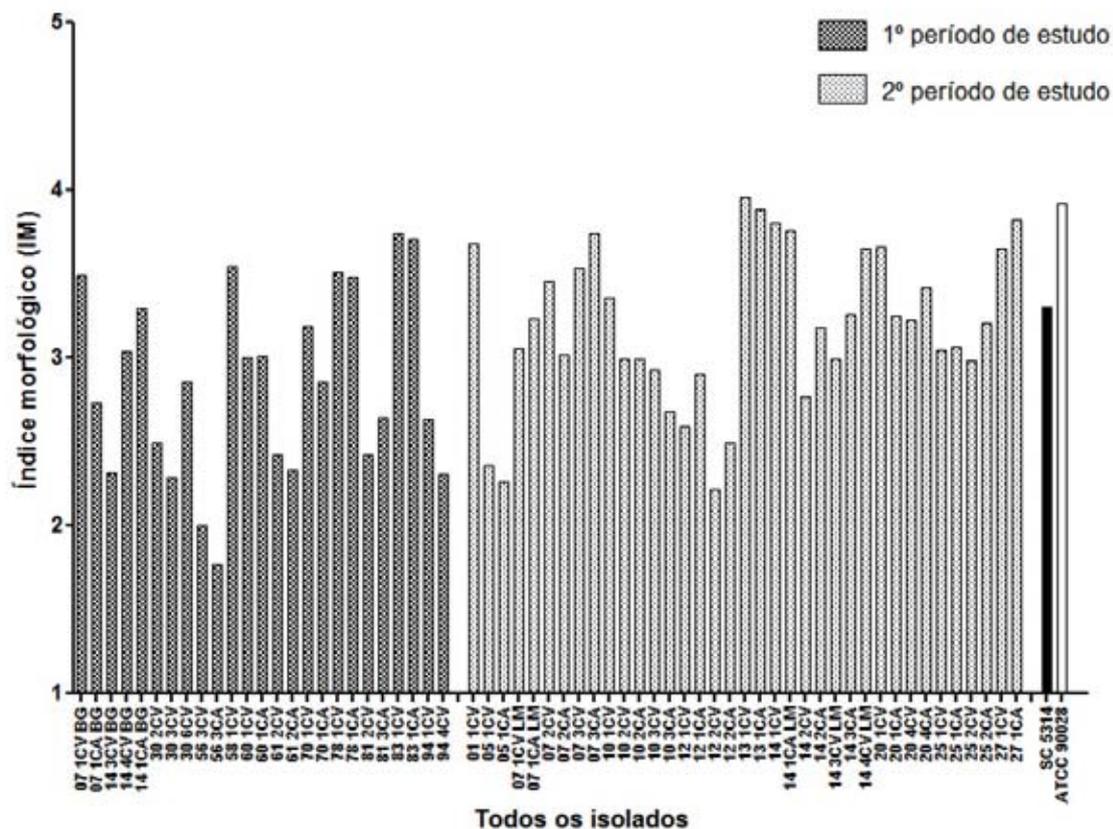
Os resultados relativos à porcentagem de formação de tubo germinativo após uma hora de incubação e IM após três horas de incubação exibiram uma ampla distribuição de valores, variando de 10,5% a 89,1%; e de 1,77 a 3,95, respectivamente (Fig. 25 e Fig. 26).

A maioria dos isolados avaliados apresentou porcentagem de formação de tubo germinativo após uma hora de incubação e IM após três horas de

incubação menores em relação às cepas de referência SC5314 e ATCC 90028, as quais apresentaram, respectivamente, 55% e 80% de formação de tubo germinativo e IM de 3,3 e 3,92 (Fig. 25 e Fig. 26).



**Figura 25.** Porcentagem de formação de tubo germinativo dos isolados de *Candida albicans* incluídos no estudo após período de incubação em soro fetal bovino a 20% em YPD por 1 h, a 37 °C, 200 rpm. Média total  $\pm$  DP = 42,1  $\pm$  20,2. Cada barra representa o valor obtido para cada isolado.



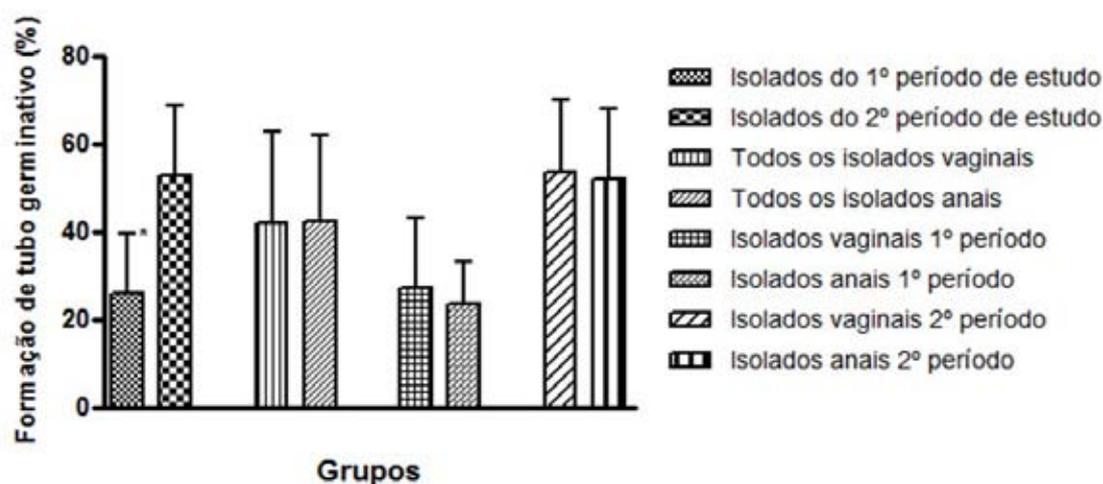
**Figura 26.** Índice morfológico (IM) dos isolados de *Candida albicans* incluídos no estudo após período de incubação em soro fetal bovino a 20% em YPD por 3 h, a 37 C°, 200 rpm. Média total  $\pm$  DP = 3,05  $\pm$  0,53. Cada barra representa o valor obtido para cada isolado.

Os isolados de *C. albicans* obtidos recentemente apresentaram uma média de formação de tubo germinativo após uma hora de incubação de 53% (DP  $\pm$  16), muito superior à apresentada pelos isolados estocados em banco de micro-organismos, que foi de 25,9% (DP  $\pm$  13,9;  $p < 0,0001$ ; Fig. 27), bem como um IM após três horas de incubação (média de 3,19; DP  $\pm$  0,47) também significativamente superior em relação ao apresentado pelos isolados estocados (média de 2,84; DP  $\pm$  0,55;  $p = 0,02$ ; Fig. 28).

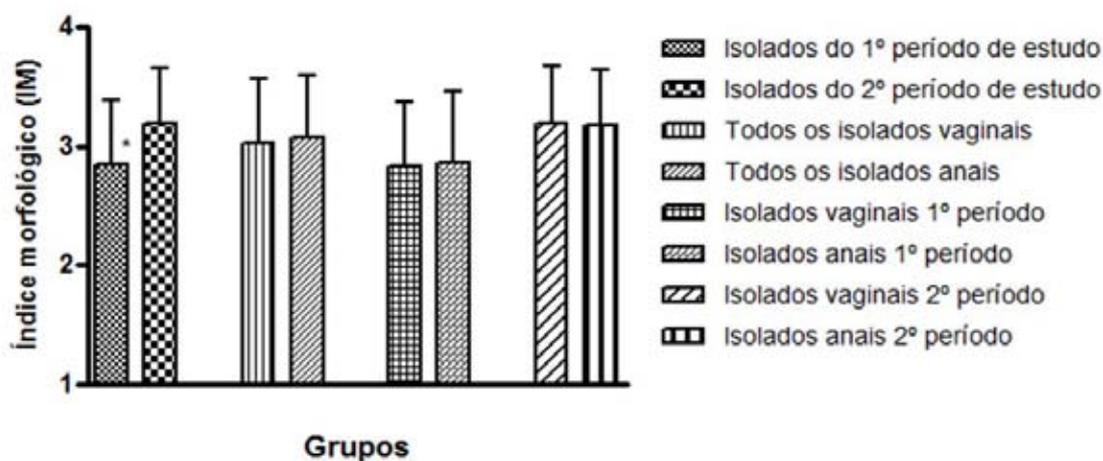
A média de formação de tubo germinativo dos 36 isolados vaginais após uma hora de incubação foi de 41,9% (DP  $\pm$  20,9), enquanto a média dos 26 isolados anais foi de 42,3% (DP  $\pm$  19,5), não havendo diferença estatisticamente significativa entre isolados vaginais infectantes e anais colonizantes ( $p = 0,78$ ; Fig. 27).

A média dos índices morfológicos dos isolados vaginais foi de 3,03 (DP  $\pm$  0,54) e a média dos isolados anais foi de 3,08 (DP  $\pm$  0,52). Da mesma maneira que para a formação de tubo germinativo após uma hora, não houve

diferença estatisticamente significativa entre isolados vaginais e anais ( $p = 0,64$ ) quanto ao IM obtido após três horas de incubação (Fig. 28).



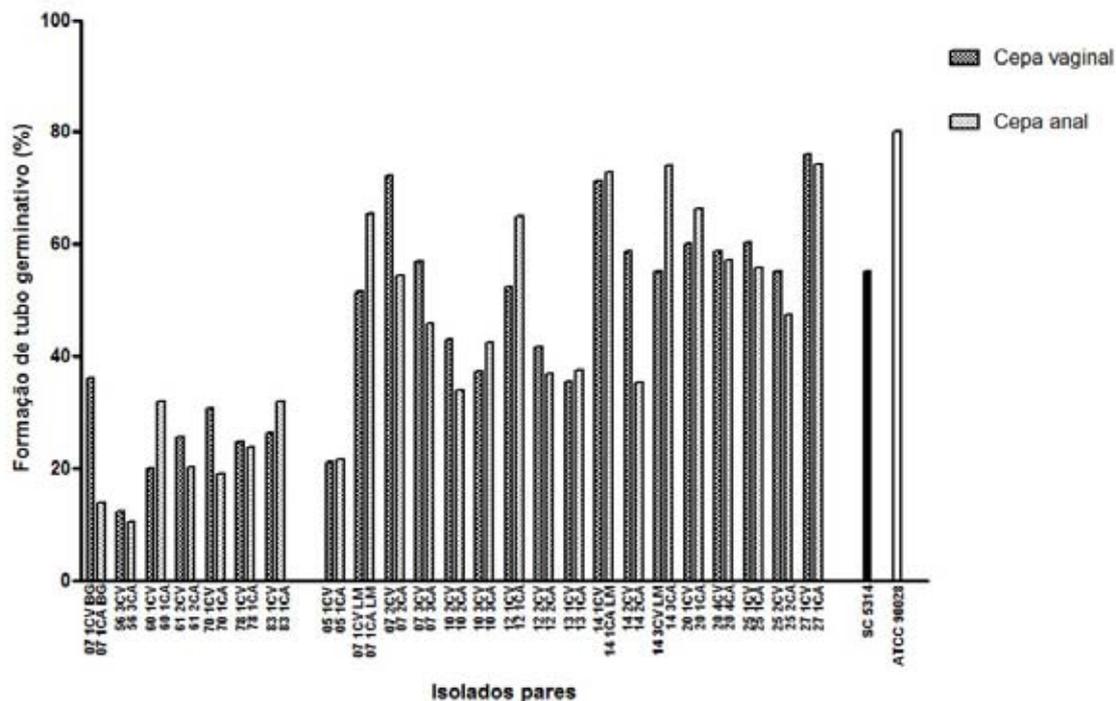
**Figura 27.** Comparação da porcentagem de formação de tubo germinativo após 1h de incubação apresentada pelos isolados de *Candida albicans* entre diferentes grupos, classificados de acordo com o período de estudo e o sítio de isolamento. Cada barra representa a média  $\pm$  DP dos resultados obtidos para todos os isolados de cada grupo. T = Desvio padrão. \* Teste de Mann-Whitney comparando-se os isolados do primeiro período de estudo com os isolados do segundo período de estudo;  $p < 0,05$ .



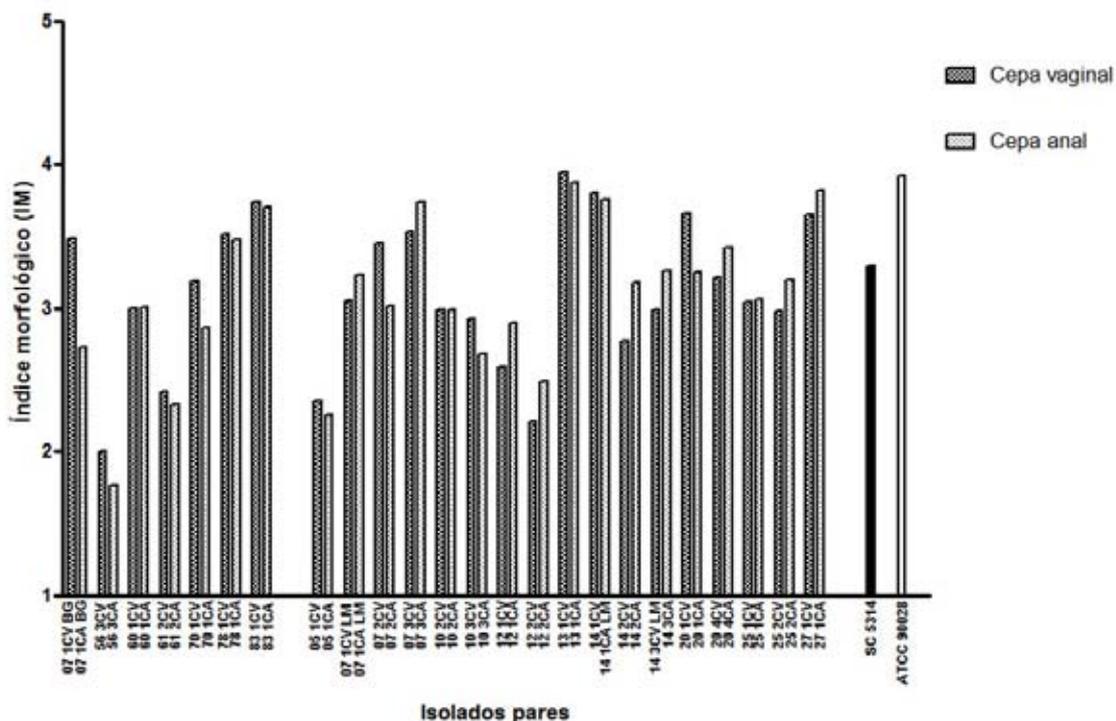
**Figura 28.** Comparação do índice morfológico (IM) após 3h de incubação apresentada pelos isolados de *Candida albicans* entre diferentes grupos, classificados de acordo com o período de estudo e o sítio de isolamento. Cada barra representa a média  $\pm$  DP dos resultados obtidos para todos os isolados de cada grupo. T = Desvio padrão. \* Teste de Mann-Whitney comparando-se os isolados do primeiro período de estudo com os isolados do segundo período de estudo;  $p < 0,05$ .

Comparando-se os isolados pares (cepa vaginal e cepa anal) obtidos de uma mesma paciente em uma mesma coleta, isoladamente, quanto à porcentagem de formação de tubo germinativo após uma hora de incubação e

IM após três horas de incubação, não se verifica tendência a maior formação de tubo germinativo por parte de isolados vaginais ou anais (Fig. 29 e Fig. 30).

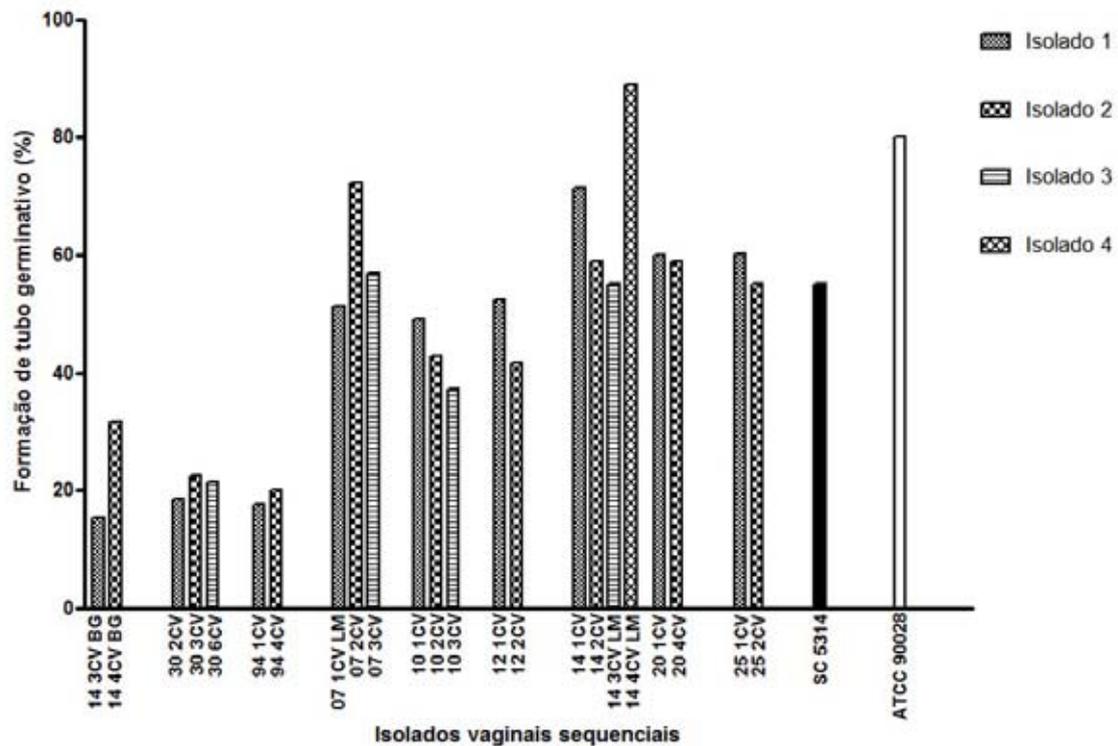


**Figura 29.** Porcentagem de formação de tubo germinativo dos pares (cepa vaginal e cepa anal) de isolados de *Candida albicans* após período de incubação em soro fetal bovino a 20% em YPD por 1 h, a 37 C°, 200 rpm. Cada barra representa o valor obtido para cada isolado.

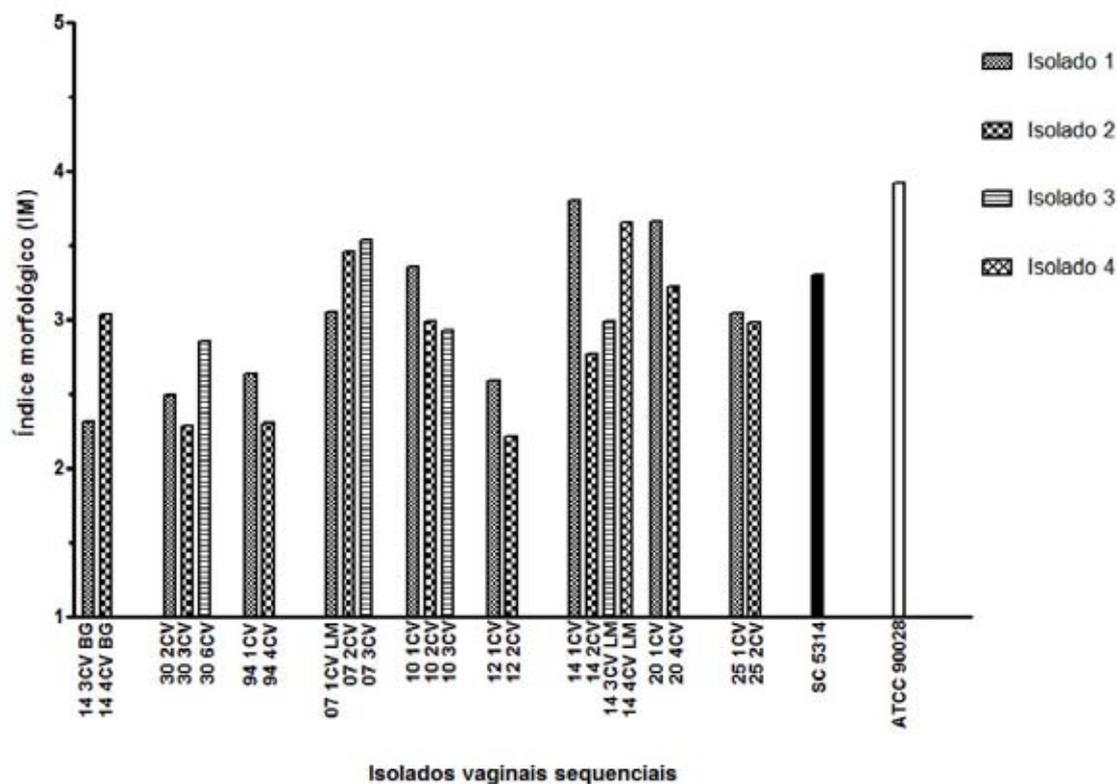


**Figura 30.** Índice morfológico dos pares (cepa vaginal e cepa anal) de isolados de *Candida albicans* após período de incubação em soro fetal bovino a 20% em YPD por 3 h, a 37 C°, 200 rpm. Cada barra representa o valor obtido para cada isolado.

Na medida em que se analisam os isolados vaginais ao longo do tempo, obtidos sequencialmente de uma mesma paciente, quanto à porcentagem de formação de tubo germinativo após uma hora de incubação e ao IM após três horas de incubação, verifica-se uma tendência discreta à redução na capacidade de filamentação dos isolados, entretanto havendo alguns casos em que ocorreu o inverso (Fig. 31 e Fig. 32).

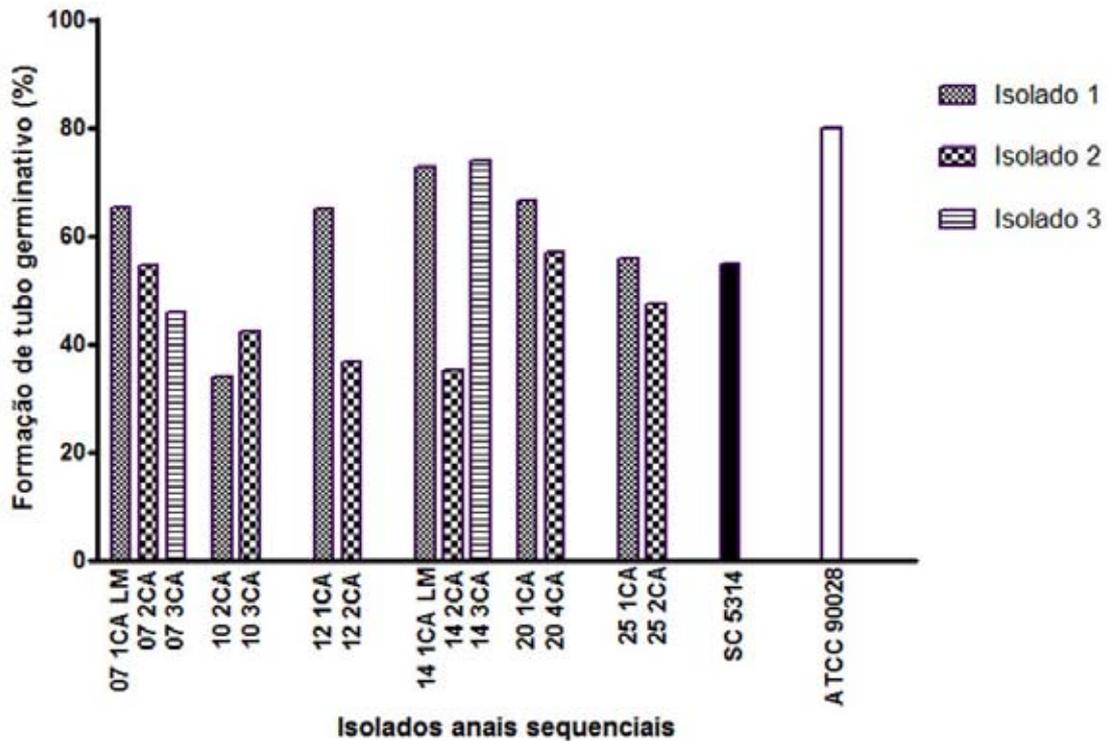


**Figura 31.** Observação do comportamento da porcentagem de formação de tubo germinativo em isolados vaginais sequenciais de *Candida albicans* após período de incubação em soro fetal bovino a 20% em YPD por 1 h, a 37 °C, 200 rpm. Cada barra representa o valor obtido para cada isolado.

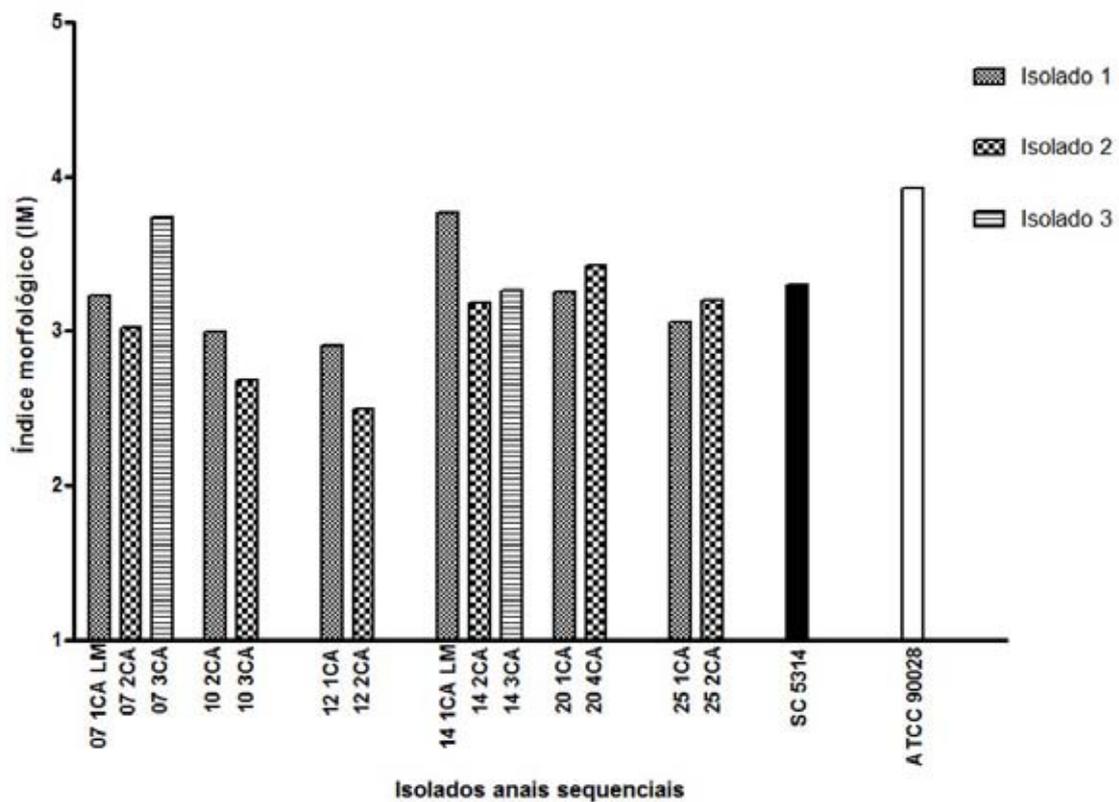


**Figura 32.** Observação do comportamento do índice morfológico (IM) em isolados vaginais sequenciais de *Candida albicans* após período de incubação em soro fetal bovino a 20% em YPD por 3 h, a 37 C°, 200 rpm. Cada barra representa o valor obtido para cada isolado.

Com relação aos isolados anais obtidos sequencialmente, tanto quanto à porcentagem de formação de tubo germinativo após uma hora de incubação (Fig. 33), quanto com relação ao IM obtido após três horas de incubação (Fig. 34), verifica-se uma tendência à redução da capacidade de filamentação dos isolados, embora as diferenças observadas para o IM tenham sido discretas.



**Figura 33.** Observação do comportamento da porcentagem de formação de tubo germinativo em isolados anais sequenciais de *Candida albicans* após período de incubação em soro fetal bovino a 20% em YPD por 1 h, a 37 C°, 200 rpm. Cada barra representa o valor obtido para cada isolado.



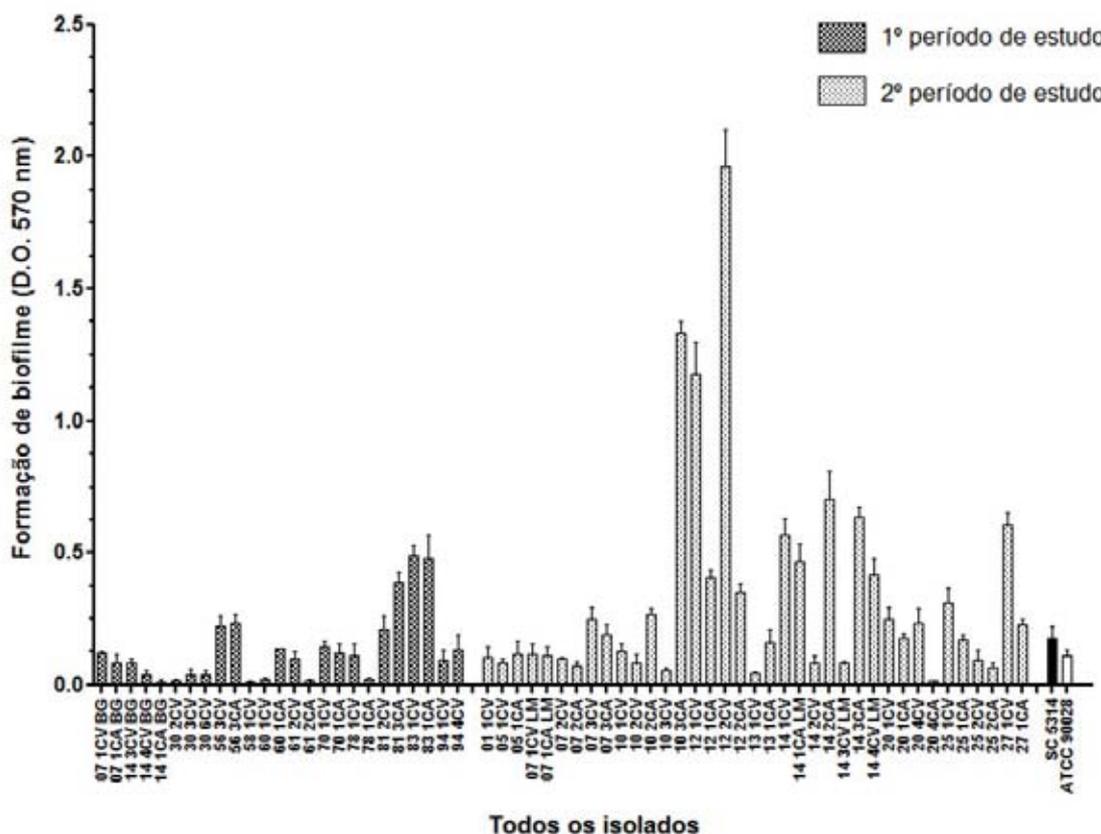
**Figura 34.** Observação do comportamento do índice morfológico (IM) em isolados anais sequenciais de *Candida albicans* após período de incubação em soro fetal bovino a 20% em YPD por 3 h, a 37 C°, 200 rpm. Cada barra representa o valor obtido para cada isolado.

### 5.5.4 Formação de biofilme

Para a avaliação da formação de biofilme, este foi induzido na presença do meio YNB + 50mM de glicose em superfície de poliestireno e quantificado pelo cristal violeta através da D.O. 570 nm.

Os 62 isolados avaliados apresentaram uma média de formação de biofilme de 0,252 (DP  $\pm$  0,337). Houve grande variabilidade na capacidade de formação de biofilme dos isolados em estudo, com amplitude de 0,009 a 1,965 (Fig. 35).

Em relação às cepas de referência SC5314 e ATCC 90028, as quais apresentaram, respectivamente, capacidade de formação de biofilme de 0,180 e 0,111, a maioria dos isolados pertencentes ao primeiro período de estudo apresentou menor capacidade de formação de biofilme, enquanto o contrário ocorreu com os isolados pertencentes ao segundo período de estudo (Fig. 35).

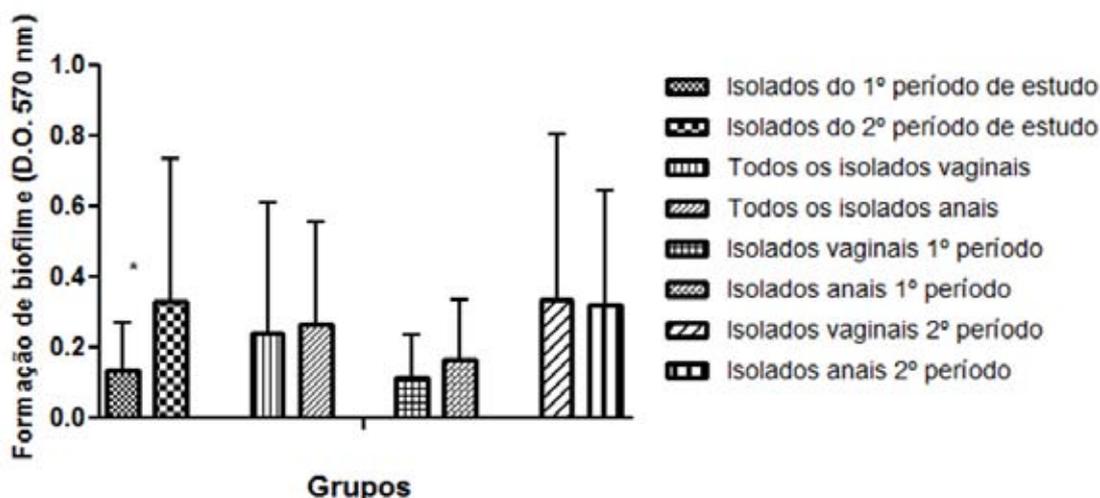


**Figura 35.** Formação de biofilme dos isolados de *Candida albicans* incluídos no estudo após período de incubação em YNB por 66 h, a 37 C°, 75 rpm. Média total  $\pm$  DP = 0,252  $\pm$  0,337. Cada barra representa a média  $\pm$  DP da triplicata obtida para cada isolado. T = Desvio padrão.

Destaca-se o primeiro isolado vaginal da paciente 12 (12 1CV), que além de altamente aderente (341 células de *C. albicans*/150 CEBH; Fig. 14) também foi altamente produtor de biofilme (1,177; Fig. 35).

Os isolados obtidos durante o primeiro período de estudo apresentaram média de formação de biofilme de 0,135 (DP  $\pm$  0,137); enquanto que os isolados obtidos no segundo período de estudo apresentaram média de formação de biofilme de 0,330 (DP  $\pm$  0,405), havendo diferença estatística entre os dois grupos mencionados ( $p=0,009$ ), indicando que os isolados de *C. albicans* obtidos recentemente apresentaram uma capacidade de formação de biofilme bastante superior à apresentada pelos isolados estocados em banco de micro-organismos (Fig. 36).

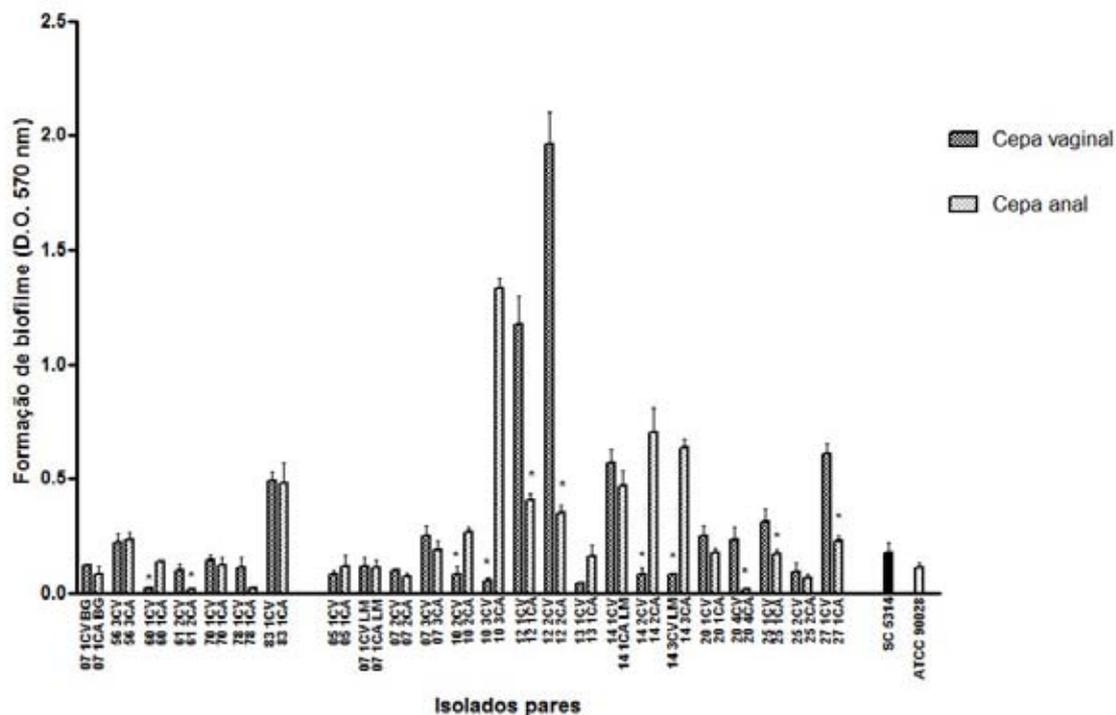
Os 36 isolados obtidos da região vaginal apresentaram uma média de formação de biofilme de 0,240 (DP  $\pm$  0,372), enquanto os 26 isolados obtidos da região anal apresentaram uma média de formação de biofilme de 0,268 (DP  $\pm$  0,288), não havendo diferença estatisticamente significativa na capacidade de formação de biofilme entre esses grupos (isolados vaginais infectantes e isolados anais colonizantes;  $p=0,29$ ; Fig. 36).



**Figura 36.** Comparação da capacidade de formação de biofilme apresentada pelos isolados de *Candida albicans* entre diferentes grupos, classificados de acordo com o período de estudo e o sítio de isolamento. Cada barra representa a média  $\pm$  DP dos resultados obtidos para todos os isolados de cada grupo. T = Desvio padrão. \* Teste de Mann-Whitney comparando-se os isolados do primeiro período de estudo com os isolados do segundo período de estudo;  $p < 0,05$ .

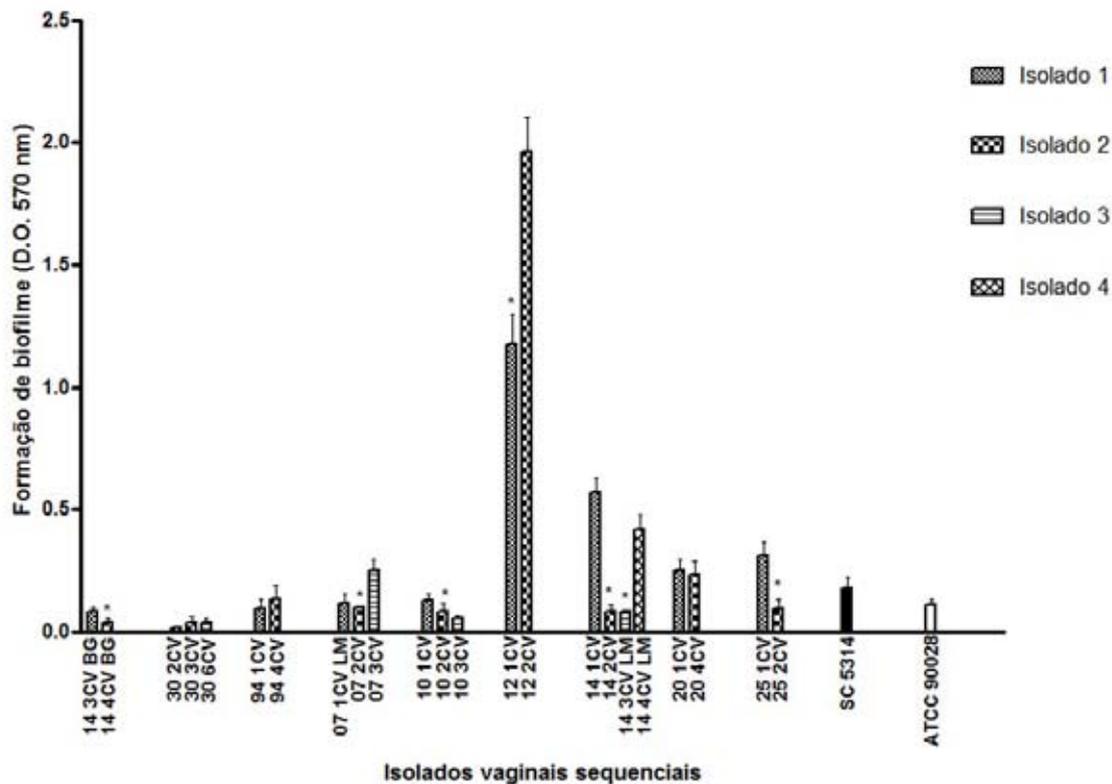
Comparando-se os isolados pares (cepa vaginal e cepa anal) recuperados de uma mesma paciente em uma mesma coleta, isoladamente,

não se observa tendência a uma maior formação de biofilme por parte dos isolados vaginais ou anais (Fig. 37).



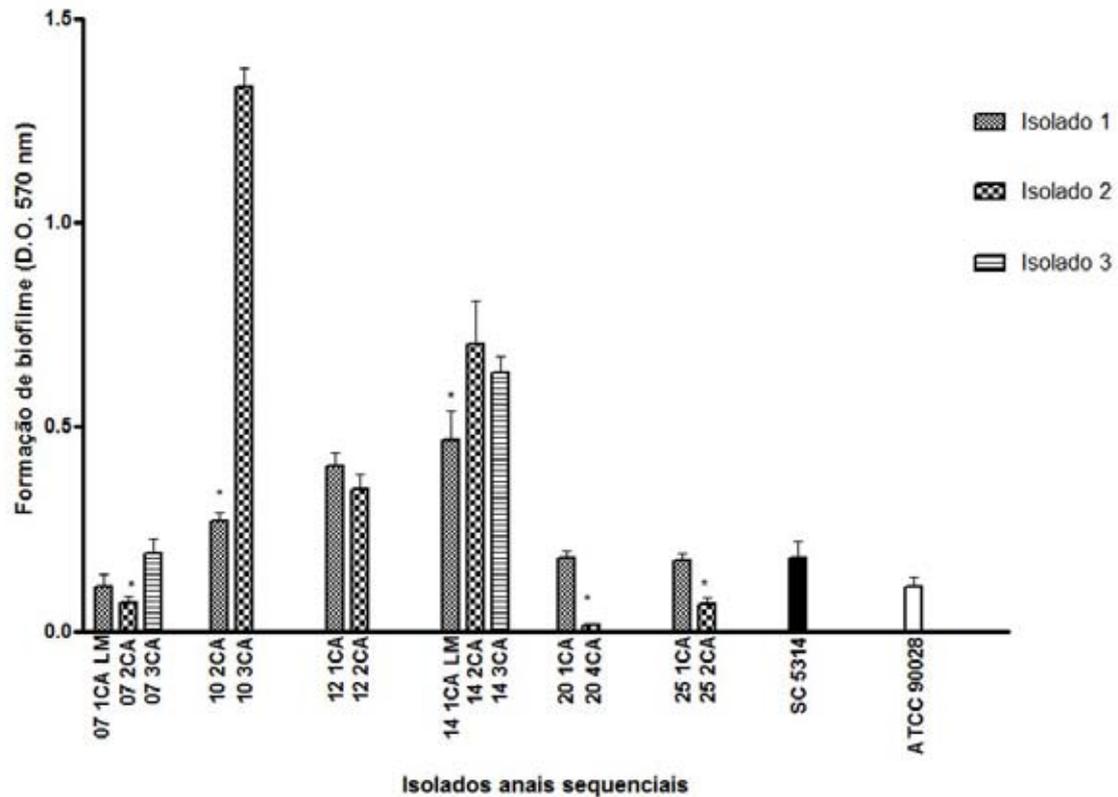
**Figura 37.** Formação de biofilme dos pares (cepa vaginal e cepa anal) de isolados de *Candida albicans* após período de incubação em YNB por 66 h, a 37 C°, 75 rpm. Cada barra representa a média  $\pm$  DP da triplicata obtida para cada isolado. T = Desvio padrão. \* Teste t de Student comparando-se os isolados vaginais com os isolados anais correspondentes;  $p < 0,05$ .

Na medida em que se analisam os isolados vaginais ao longo do tempo, obtidos sequencialmente de uma mesma paciente, verifica uma tendência discreta à redução na formação de biofilme (Fig. 38).



**Figura 38.** Observação do comportamento da capacidade formação de biofilme em isolados vaginais sequenciais de *Candida albicans* após período de incubação em YNB por 66 h, a 37 C°, 75 rpm. Cada barra representa a média  $\pm$  DP da triplicata obtida para cada isolado. T = Desvio padrão. \* Teste t de Student comparando-se os isolados vaginais de cada paciente entre si;  $p < 0,05$ .

Com relação aos isolados anais obtidos sequencialmente, não é possível visualizar nenhuma tendência clara à diminuição ou aumento na capacidade de formação de biofilme (Fig. 39).



**Figura 39.** Observação do comportamento da capacidade de formação de biofilme em isolados vaginais sequenciais de *Candida albicans* após período de incubação em YNB por 66 h, a 37 C°, 75 rpm. Cada barra representa a média  $\pm$  DP da triplicata obtida para cada isolado. T = Desvio padrão. \* Teste t de Student comparando-se os isolados vaginais de cada paciente entre si;  $p < 0,05$ .

## 5.6 AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE OS FATORES DE VIRULÊNCIA

Com o intuito de verificar uma possível correlação entre os diversos fatores de virulência estudados (capacidade de aderência, atividade de proteinase, morfogênese e biofilme), aplicou-se um teste estatístico para a obtenção do coeficiente de correlação de Spearman, o qual mede o grau de relação linear entre duas variáveis quantitativas.

Verificou-se correlação linear fracamente negativa, de forma significativa, entre capacidade de aderência e atividade de proteinase; e entre formação de biofilme e atividade de proteinase; indicando que, quanto maior a atividade de proteinase, menor a capacidade de aderência e a formação de biofilme (Tabela 7, Fig. 40).

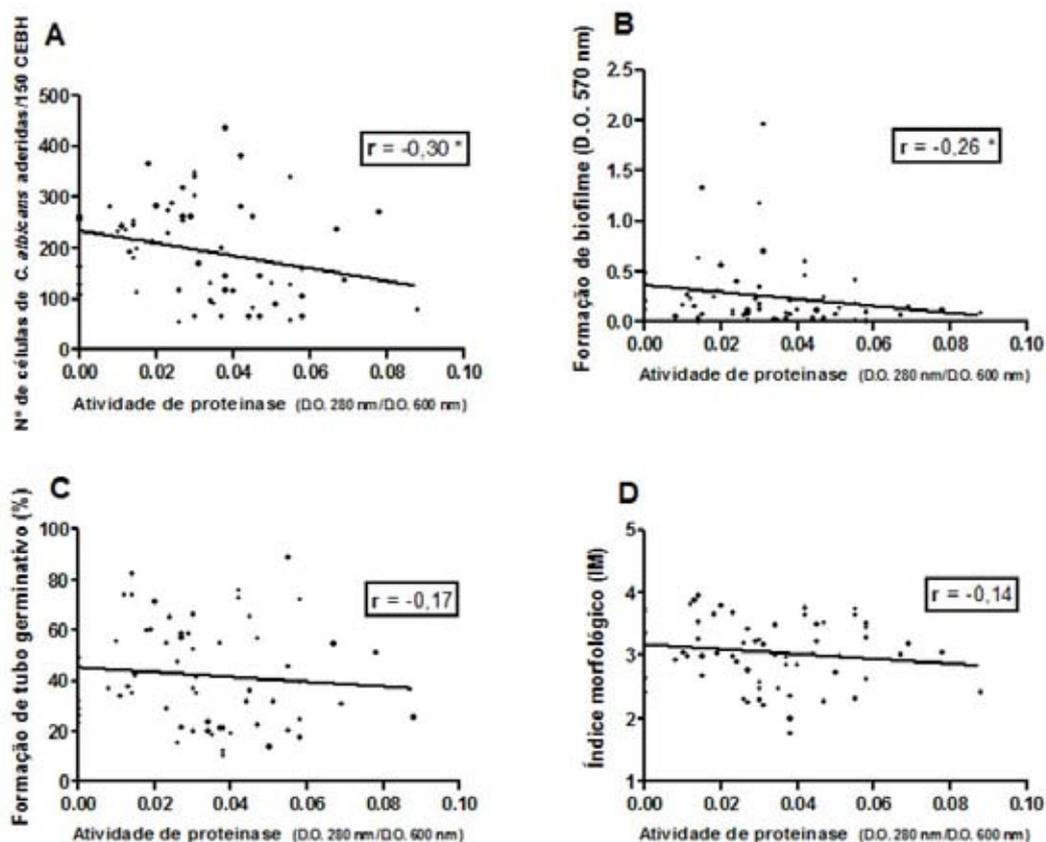
Correlação linear fracamente positiva, de forma significativa, foi encontrada entre formação de biofilme e capacidade de aderência; e entre formação de biofilme e porcentagem de formação de tubo germinativo após 1h de incubação; indicando que, quanto maior a capacidade de aderência e a capacidade de filamentação após 1h apresentada pelos isolados de *C. albicans*, maior a formação de biofilme pelos mesmos (Tabela 7, Fig. 41).

Observou-se correlação linear moderadamente positiva, de forma significativa, entre capacidade de aderência e porcentagem de formação e tubo germinativo após 1h de incubação; e entre índice morfológico (IM) após 3h de incubação e porcentagem de formação de tubo germinativo após 1h de incubação; indicando que, quanto maior a capacidade de filamentação após 1h apresentada pelos isolados de *C. albicans*, maior a capacidade de aderência e maior IM após 3h de incubação dos mesmos (Tabela 7, Fig. 41).

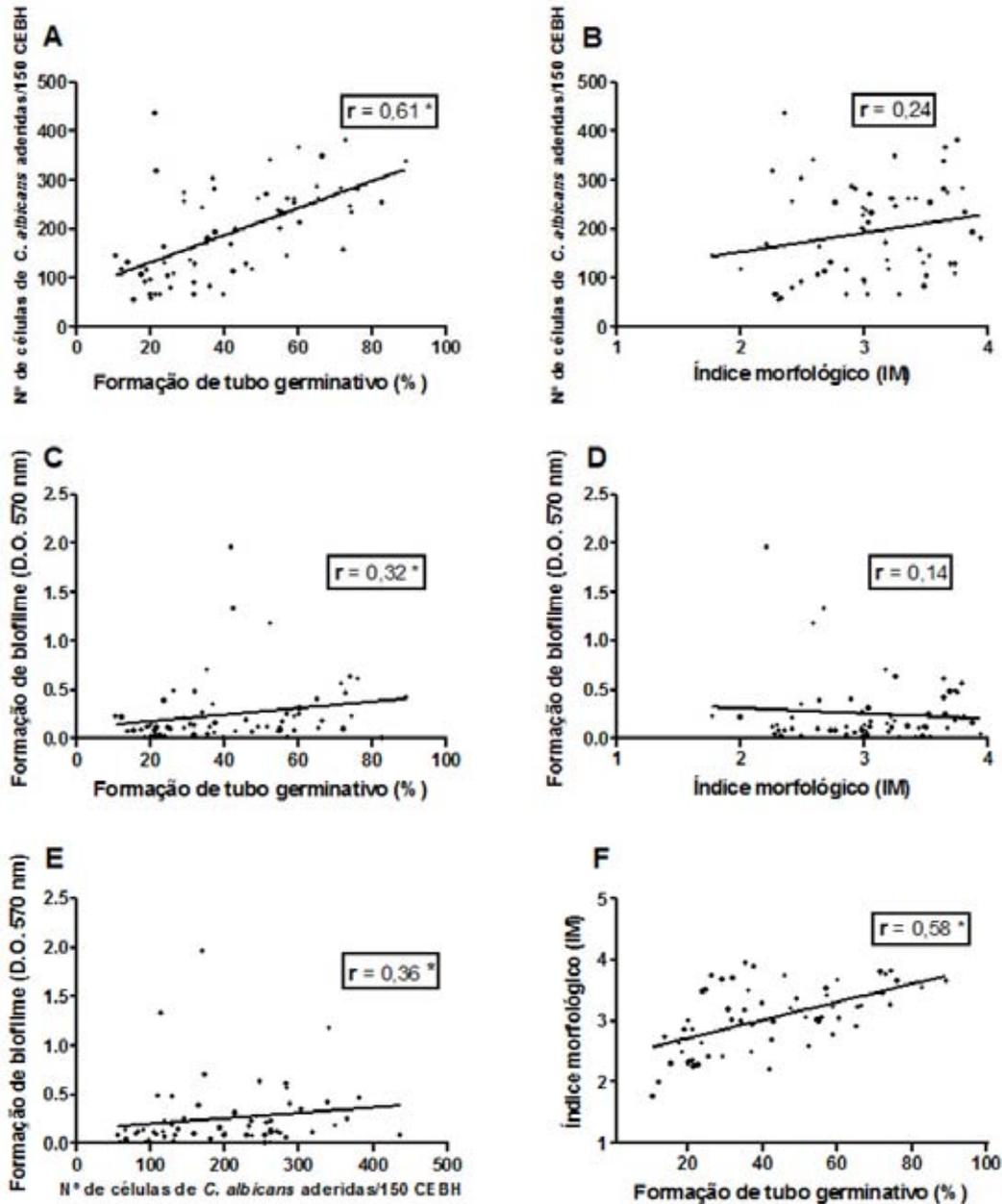
**Tabela 7** – Correlação entre os fatores de virulência avaliados no estudo

Comparação	r	Interpretação	p valor
<b>Aderência x Proteinase</b>	-0,30	Fraca negativa	0,02 *
<b>Biofilme X Proteinase</b>	-0,26	Fraca negativa	0,04 *
<b>% tubo X Proteinase</b>	-0,17	Fraca negativa	0,19
<b>IM X Proteinase</b>	-0,14	Fraca negativa	0,26
<b>Aderência X % tubo</b>	0,61	Moderada positiva	<0,0001 *
<b>Aderência X IM</b>	0,24	Fraca positiva	0,06
<b>Biofilme X % tubo</b>	0,32	Fraca positiva	0,01 *
<b>Biofilme X IM</b>	0,14	Fraca positiva	0,29
<b>Biofilme X Aderência</b>	0,36	Fraca positiva	0,0039 *
<b>IM X % tubo</b>	0,58	Moderada positiva	<0,0001 *

FONTE: Livro de registro do Laboratório de Micologia Médica e Molecular, UFRN. Nota: % tubo = Porcentagem de formação de tubo germinativo após 1h de incubação; IM = Índice morfológico após 3h de incubação; r = Coeficiente de correlação de Spearman; p valor obtido através do teste de Spearman.



**Figura 40.** Correlação entre atividade de proteinase e os demais fatores de virulência: (A) capacidade de aderência às CEBH; (B) formação de biofilme; (C) porcentagem de formação de tubo germinativo após 1h de incubação; (D) índice morfológico após 3h de incubação. r = Coeficiente de correlação de Spearman.



**Figura 41.** (A) Correlação entre capacidade de aderência às CEBH e porcentagem de formação de tubo germinativo após 1h de incubação; (B) correlação entre capacidade de aderência às CEBH e índice morfológico após 3h de incubação; (C) correlação entre capacidade de formação de biofilme e porcentagem de formação de tubo germinativo após 1h de incubação; (D) correlação entre capacidade de formação de biofilme e índice morfológico após 3h de incubação; (E) correlação entre capacidade de formação de biofilme e capacidade de aderência às CEBH; (F) correlação entre índice morfológico (IM) após 3h de incubação e porcentagem de formação de tubo germinativo após 1h de incubação.  $r$  = Coeficiente de correlação de Spearman.

## 5.7 AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DOS SINAIS E SINTOMAS, DOS FATORES PREDISPOANTES E DO USO DE ANTIFÚNGICOS COM OS FATORES DE VIRULÊNCIA

Apenas os isolados de *C. albicans* obtidos das pacientes participantes do segundo período de estudo (novembro de 2011 a agosto de 2012) foram considerados nesta avaliação.

Com o objetivo de avaliar a influência dos fatores de virulência estudados (capacidade de aderência a CEBH, atividade de proteinase, morfogênese e biofilme) sobre os sinais e sintomas de CVV apresentados pelas pacientes, comparou-se os valores de cada fator de virulência entre isolados vaginais de *C. albicans* obtidos quando a paciente estava apresentando até dois sinais ou sintomas e isolados vaginais obtidos quando a paciente apresentava mais de dois sinais ou sintomas.

Apenas se observou diferença estatisticamente significativa com relação à porcentagem de formação de tubo germinativo após 1h de incubação ( $p=0,03$ ), embora as médias gerais dos valores de todos os fatores de virulência tenham sido superiores nas situações com mais sinais e sintomas em relação às médias apresentadas nas situações com poucos sinais ou sintomas (Tabela 8).

**Tabela 8** – Comparação entre os valores dos fatores de virulência dos isolados clínicos vaginais na presença de diferentes condições clínicas de CVV

Fator de virulência	Quantidade de sinais e sintomas de CVV		p valor
	Até dois	Mais de dois	
Capacidade de aderência	244 (DP±96)	271 (DP±46)	0,26
Atividade de proteinase	0,028 (DP±0,016)	0,034 (DP±0,021)	0,47
Formação de tubo germinativo após 1h	45,2% (DP±15,6)	62,2% (DP±12,8)	0,03*
IM após 3h	3,18 (DP±0,58)	3,21 (DP±0,40)	0,97
Formação de biofilme	0,302 (DP±0,589)	0,374 (DP±0,342)	0,05

FONTE: Livro de registro e dados clínicos obtidos através da aplicação de questionário (APÊNDICE B), armazenados no Laboratório de Micologia Médica e Molecular, UFRN. Nota: IM= Índice morfológico; DP= Desvio padrão; p valor obtido através do teste de Mann-Whitney; \*= $p<0,05$ .

Comparando-se os 16 isolados vaginais de *C. albicans* obtidos de pacientes com CVV esporádica com os quatro isolados obtidos de pacientes com CVVR quanto aos fatores de virulência, não se observou nenhuma diferença estatisticamente significativa.

Com a finalidade de avaliar a influência dos fatores predisponentes de CVV apresentados pelas pacientes sobre os fatores de virulência estudados (capacidade de aderência a CEBH, atividade de proteinase, morfogênese e biofilme), comparou-se os valores de cada fator de virulência entre isolados vaginais de *C. albicans* obtidos quando a paciente apresentava até dois fatores predisponentes e isolados vaginais obtidos quando a paciente apresentava mais de dois fatores predisponentes.

Não se observou diferença estatisticamente significativa com relação a nenhum dos fatores de virulência. Porém, as médias dos valores de todos os fatores de virulência, com exceção da aderência, foram superiores nas situações com mais fatores predisponentes em relação às médias apresentadas nas situações com poucos fatores predisponentes (Tabela 9).

**Tabela 9** – Comparação entre os valores dos fatores de virulência dos isolados clínicos vaginais na presença de diferentes situações predisponentes à CVV

Fator de virulência	Quantidade de fatores predisponentes de CVV		p valor
	Até dois	Mais de dois	
Capacidade de aderência	292 (DP±70)	222,0 (DP±64,0)	0,06
Atividade de proteinase	0,028 (DP±0,014)	0,033 (DP±0,023)	0,62
Formação de tubo germinativo após 1h	52,8% (DP±20,8)	54,6% (DP±11,6)	1,0
IM após 3h	3,19 (DP±0,46)	3,20 (DP±0,53)	0,91
Formação de biofilme	0,200 (DP±0,183)	0,476 (DP±0,625)	0,24

FONTE: Livro de registro e dados clínicos obtidos através da aplicação de questionário (APÊNDICE B), armazenados no Laboratório de Micologia Médica e Molecular, UFRN. Nota: IM= Índice morfológico; DP= Desvio padrão; p valor obtido através do teste de Mann-Whitney.

Para avaliar a influência do uso de antifúngicos pelas pacientes sobre os fatores de virulência estudados (capacidade de aderência a CEBH, atividade de proteinase, morfogênese e biofilme), comparou-se os valores de cada fator

de virulência entre isolados vaginais de *C. albicans* obtidos quando a paciente se encontrava em uso de antifúngicos ou havia utilizado há pouco tempo previamente às coletas (até 10 dias anteriores) e isolados vaginais obtidos quando a paciente não estava em uso de antifúngicos ou havia utilizado há mais de 10 dias.

Não se observou diferença estatisticamente significativa com relação à expressão de nenhum dos fatores de virulência em função do uso de antifúngicos (Tabela 10).

**Tabela 10** – Comparação entre os valores dos fatores de virulência dos isolados clínicos vaginais na ausência ou presença de antifúngico

Fator de virulência	Uso de antifúngicos		p valor
	Ausente	Presente	
Capacidade de aderência	264 (DP±71)	244 (DP±85)	0,58
Atividade de proteinase	0,027 (DP±0,019)	0,037 (DP±0,016)	0,20
Formação de tubo germinativo após 1h	50,5% (DP±15,1)	59,6% (DP±18,3)	0,27
IM após 3h	3,07 (DP±0,53)	3,42 (DP±0,31)	0,18
Formação de biofilme	0,419 (DP±0,567)	0,187 (DP±0,125)	0,90

FONTE: Livro de registro e dados clínicos obtidos através da aplicação de questionário (APÊNDICE B), armazenados no Laboratório de Micologia Médica e Molecular, UFRN. Nota: IM= Índice morfológico; DP= Desvio padrão; p valor obtido através

## 5.8 GENOTIPAGEM DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE *C. albicans*

### 5.8.1 Genotipagem ABC

Um dos métodos utilizados para a genotipagem dos isolados clínicos de *C. albicans* inclusos neste estudo foi aquele descrito por Mccullough et al. (1999), que discrimina as cepas de *C. albicans* em três genótipos (A, B e C), assim como permite identificar *C. dubliniensis* (genótipo D), espécie fenotipicamente indistinguível de *C. albicans*, baseando-se em tamanhos distintos dos produtos de amplificação de um íntron presente no gene 26 S do rRNA, que varia entre os diversos genótipos.

Realizou-se a genotipagem dos 62 isolados clínicos de *C. albicans* inclusos no estudo (Fig. 42). Verificou-se que a maioria (58; 93,6%) dos isolados analisados pertence ao genótipo A, enquanto apenas quatro (6,4%) cepas, correspondendo a dois isolados vaginais e dois isolados anais obtidos sequencialmente da mesma paciente, pertencem ao genótipo C. Dentre os isolados vaginais e anais também se verifica maior prevalência do genótipo A. Nenhum isolado do genótipo B, bem como nenhum isolado de *C. dubliniensis* (genótipo D) foi encontrado, havendo 100% de concordância com os resultados obtidos pela triagem fenotípica realizada para a diferenciação entre *C. albicans* e *C. dubliniensis* (Tabela 11).

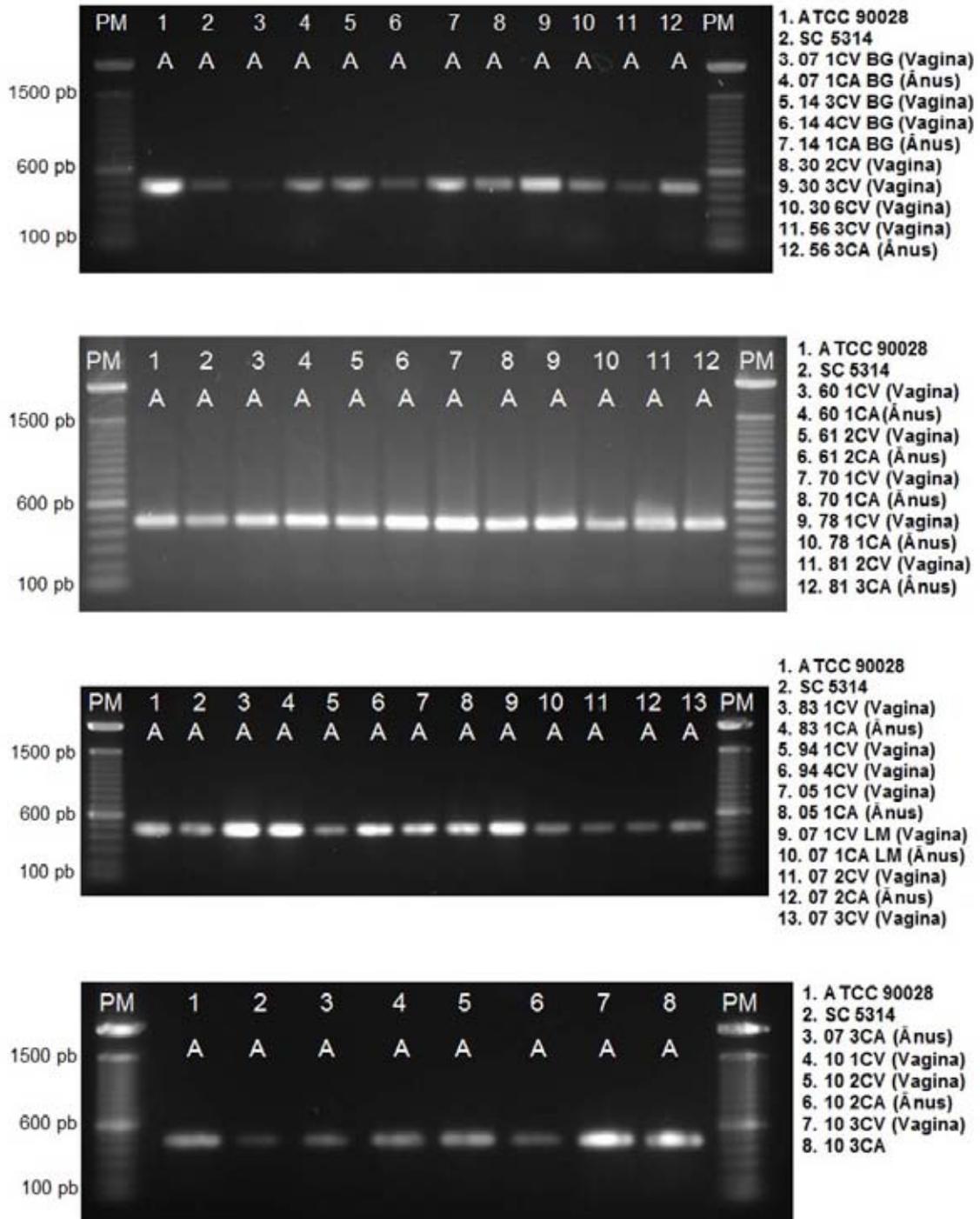
**Tabela 11** – Distribuição dos isolados clínicos de *Candida albicans* do presente estudo quanto ao genótipo ABC encontrado

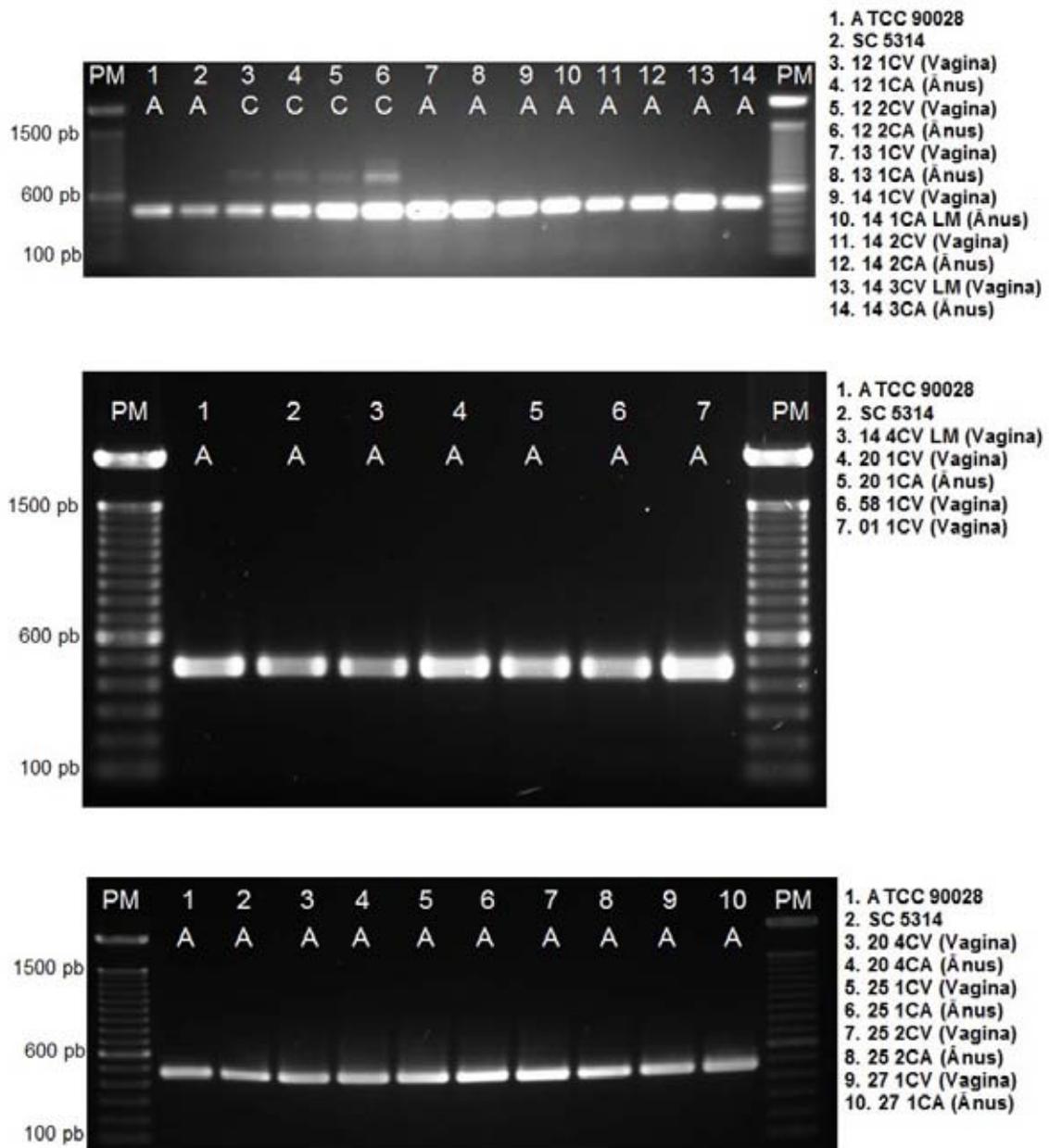
Genótipo	Nº total de isolados de <i>C. albicans</i> (%)	Nº de isolados vaginais de <i>C. albicans</i> (%)	Nº de isolados anais de <i>C. albicans</i> (%)
A	58 (93,6%)	34 (94,4%)	24 (92,3%)
B	0	0	0
C	4 (6,4%)	2 (5,6%)	2 (7,7%)
D	0	0	0

FONTE: Livro de registro do Laboratório de Micologia Médica e Molecular, UFRN.

Considerando-se separadamente as sequências de isolados vaginais e anais obtidos da mesma paciente ao longo do tempo, bem como os pares de

isolados (cepa vaginal e cepa anal obtidas da mesma paciente em um mesmo momento), observou-se que todos os isolados sequenciais e/ou pares pertencem ao mesmo genótipo, não havendo substituição por cepa de outro genótipo (A, B ou C) ao longo do tempo e constatando-se que o isolado anal sempre apresenta o mesmo genótipo do isolado vaginal, avaliando-se exclusivamente a técnica de genotipagem ABC (Fig. 42).





**Figura 42.** Genotipagem ABC dos isolados clínicos de *Candida albicans* incluídos no estudo. PM = Marcador de peso molecular; pb = pares de base. Os números correspondem ao número de registro no banco de micro-organismos do LMMM.

### 5.8.2 Genotipagem por microssatélites e RAPD

Outros dois métodos de genotipagem foram utilizados para a caracterização genotípica dos isolados clínicos de *C. albicans* inclusos neste estudo: a genotipagem baseada na amplificação do DNA genômico com o “primer” M13, direcionado a sequências de microssatélite repetitivas no genoma; e o RAPD (“Random Amplification of Polymorphic DNA”), utilizando o “primer” B14.

Ambas as metodologias citadas geraram padrão de bandas característicos da espécie (*C. albicans*), representado por bandas de alta intensidade, bem como apresentaram suficiente poder discriminatório intraespecífico, sendo possível visualizar diferenças genotípicas entre a maioria dos isolados de *C. albicans*, diferenciando-os em cepas distintas (Fig. 43 e Fig. 44).

Na genotipagem por microssatélites, houve um satisfatório agrupamento das cepas geneticamente relacionadas das diferentes pacientes, sendo possível a distinção de três “clusters” com similaridade em torno de 80% (Fig. 45); enquanto na genotipagem por RAPD este agrupamento ocorreu, embora com algumas exceções, talvez devido ao maior poder discriminatório da técnica, havendo a distinção de seis “clusters” com similaridade em torno de 80% (Fig. 46).

Em ambas as técnicas, as cepas de referência SC 5314 e ATCC 90028, obtidas em diferentes regiões geográficas, foram agrupadas em “clusters” totalmente distintos, sendo consideradas não relacionadas (similaridade em torno de 70% ou menos), confirmando o poder discriminatório das metodologias empregadas (Fig. 45 e Fig. 46).

A maioria dos “clusters” diferenciados nos dendrogramas gerados por ambas as técnicas de genotipagem englobam isolados obtidos de pacientes com CVV esporádica e de pacientes com CVVR, não havendo diferença genética significativa entre os isolados obtidos dos dois grupos de pacientes, embora alguns “clusters” tenham incluído apenas isolados de pacientes com CVV esporádica ou com CVVR em ambas as técnicas utilizadas (Fig. 45 e Fig. 46).

Analisando-se o relacionamento genético entre isolados pares (cepa vaginal e cepa anal) obtidos da mesma paciente em um mesmo momento, verifica-se que na maioria das situações (62,5% com a técnica de RAPD e 70,8% através da genotipagem por microssatélites) estes isolados apresentam alta porcentagem de similaridade (em torno de 90% ou mais) ou foram considerados idênticos (100% de similaridade), embora haja situações em que estes isolados mostram-se não relacionados (similaridade menor que 75%), sugerindo a existência de cepas diferentes causando a infecção vaginal e colonizando o ânus (Tabela 12).

**Tabela 12** – Distribuição dos isolados pares (cepa vaginal e cepa anal) de *Candida albicans* quanto ao grau de relacionamento genético

<b>Grau de relacionamento genético</b>	<b>% de similaridade genética</b>	<b>RAPD n (%)</b>	<b>Microssatélite n (%)</b>
<b>Não relacionadas</b>	≤ 75%	4 (16,7%)	1 (4,2%)
<b>Moderadamente relacionadas</b>	≈ 80%	5 (20,8%)	6 (25%)
<b>Altamente relacionadas</b>	≈ 90%	12 (50%)	9 (37,5%)
<b>Idênticas</b>	100%	3 (12,5%)	8 (33,3%)

FONTE: Livro de registro do Laboratório de Micologia Médica e Molecular, UFRN. Classificação de relacionamento genético baseada em SOLL (2000).

Em ambas as técnicas de genotipagem empregadas (RAPD e microssatélites), verifica-se tendência à microevolução das cepas sequenciais vaginais isoladas de uma mesma paciente ao longo do tempo; ou seja, a cepa se mantém, porém com pequenas alterações genéticas percebidas pela presença de poucas bandas diferentes (similaridade maior que 75%; Tabela 13).

Contudo, em algumas situações, observou-se substituição completa da cepa vaginal, principalmente observada através do emprego da técnica de RAPD (4; 44,4%); enquanto a manutenção da cepa vaginal sem alterações genéticas só foi observada através da técnica de microssatélites, em uma única situação (11,1%; Tabela 13).

As cepas 58 1CV e 01 1CV, obtidas da mesma paciente com CVVR nos dois períodos de estudo distintos, coletadas com pelo menos seis anos de diferença, apresentaram 100% de similaridade em ambas as técnicas de

genotipagem empregadas, indicando manutenção da mesma cepa infectante vaginal (Fig. 45 e Fig. 46).

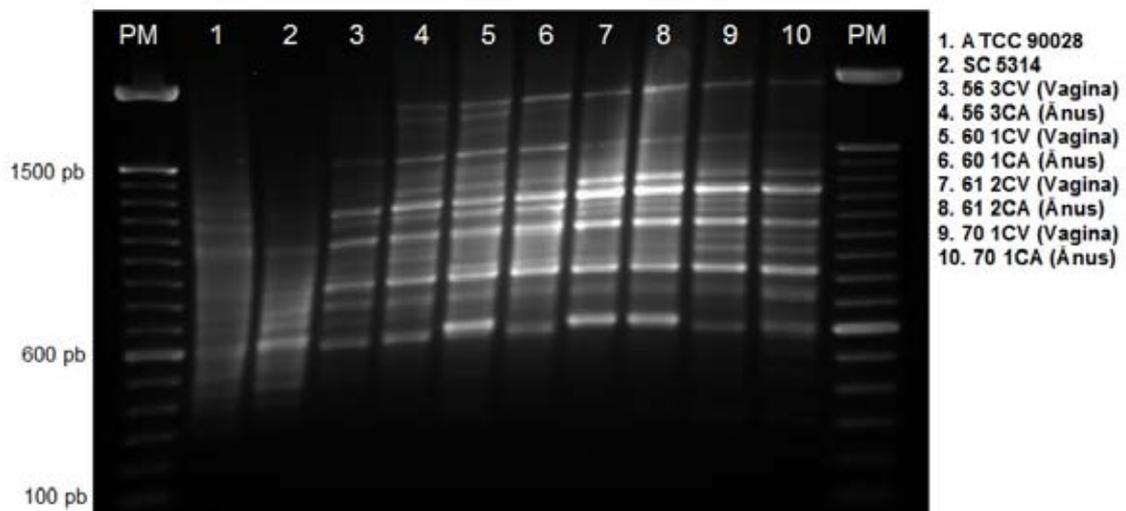
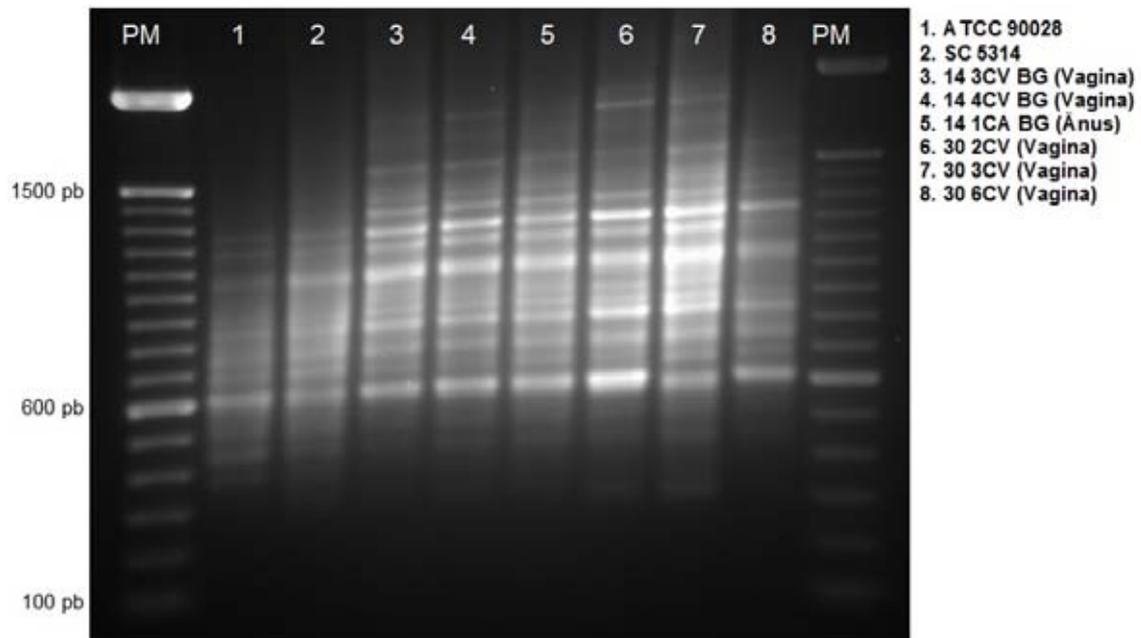
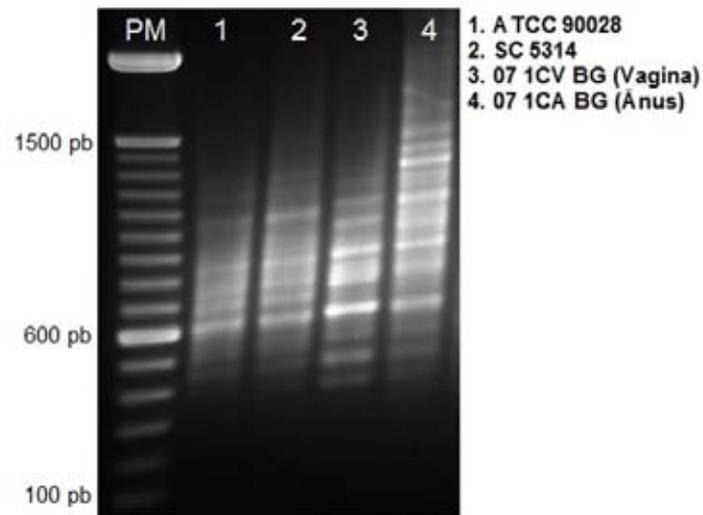
Quanto aos isolados anais obtidos sequencialmente da mesma paciente, observam-se resultados divergentes entre as duas técnicas de genotipagem (RAPD e microssatélites) empregadas, observando-se tendência à substituição da cepa anal através da técnica de RAPD e tendência à microevolução da cepa anal através da técnica de microssatélites. Entretanto, não houve persistência da mesma cepa anal (100% de similaridade), de acordo com as duas metodologias avaliadas (Tabela 13).

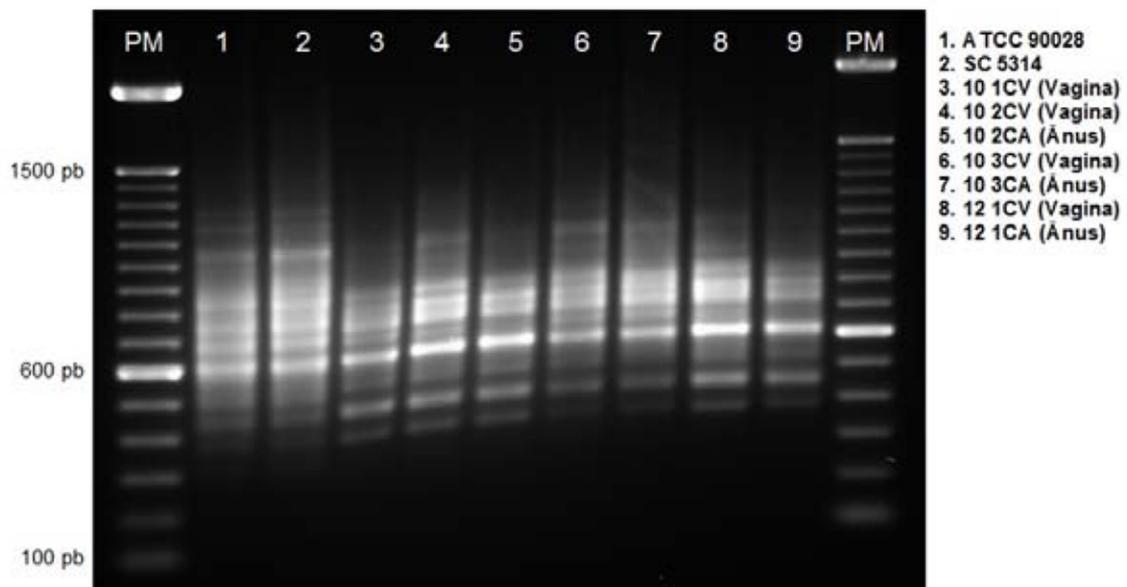
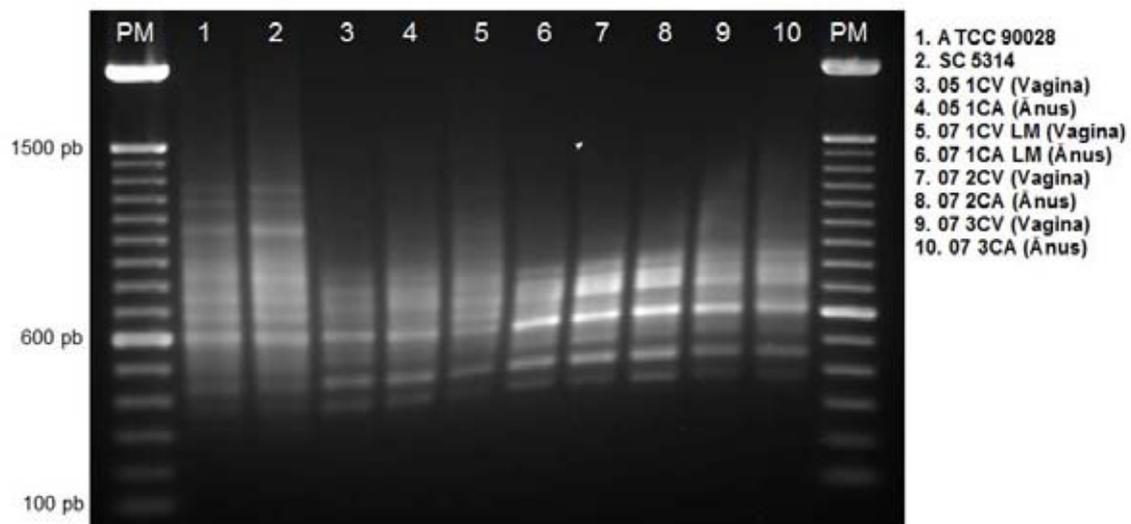
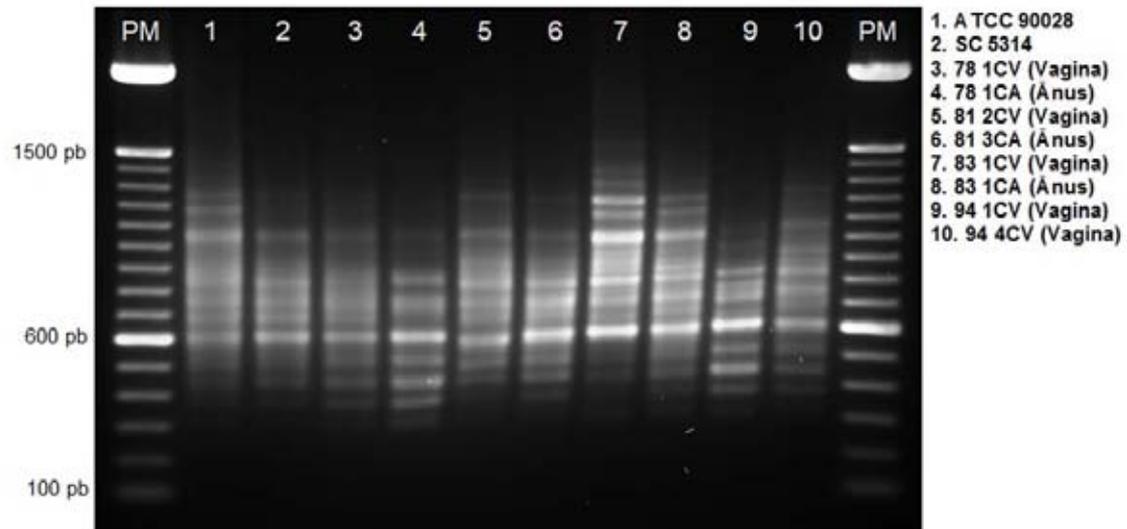
**Tabela 13** – Distribuição dos isolados sequenciais vaginais e anais de *Candida albicans* quanto ao grau de alteração genética ao longo do tempo

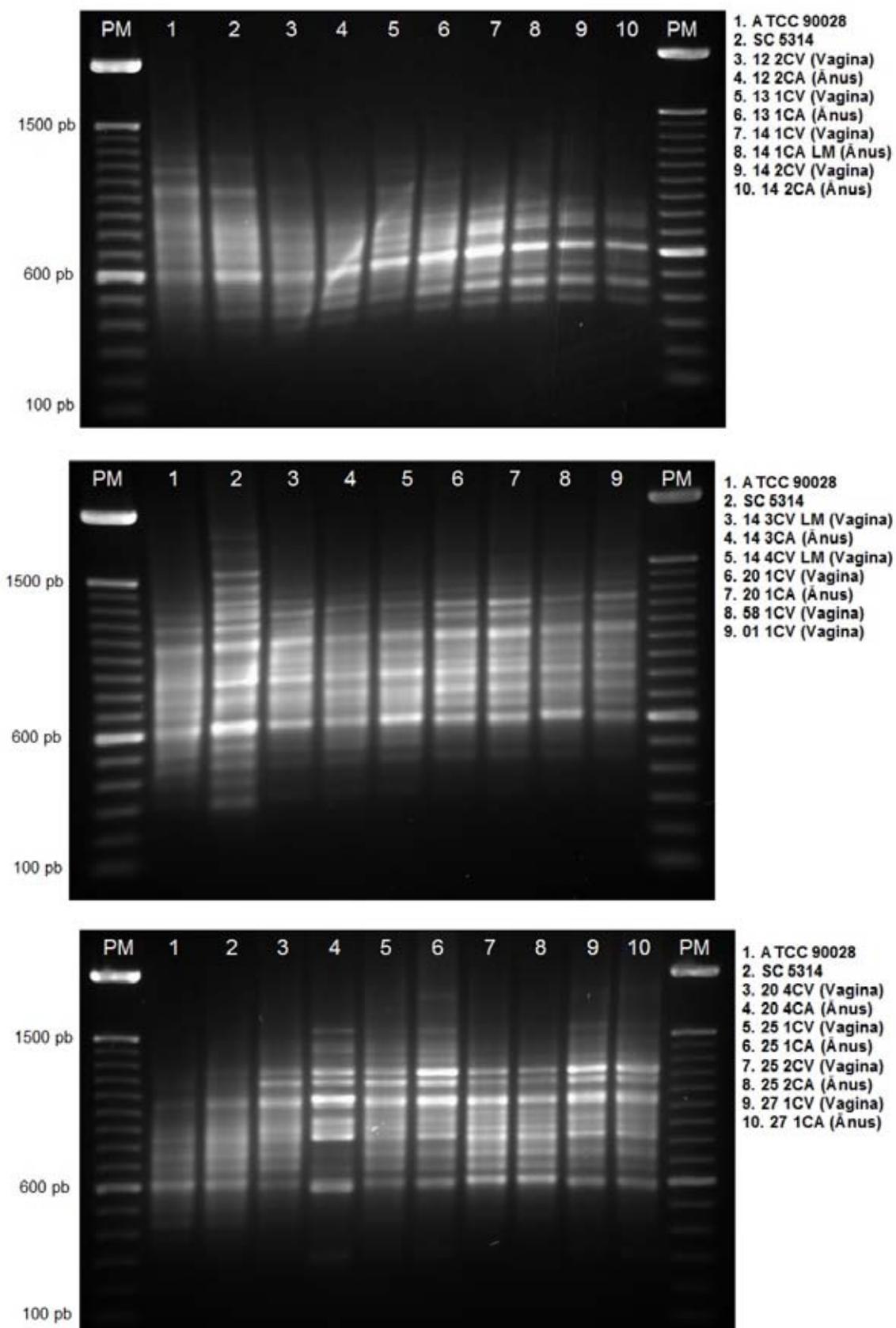
Grau de alteração genética	RAPD		Microssatélite	
	Sequências vaginais n (%)	Sequências anais n (%)	Sequências vaginais n (%)	Sequências anais n (%)
<b>Substituição</b>	4 (44,4%)	4 (66,7%)	2 (22,2%)	1 (16,7%)
<b>Microevolução</b>	5 (55,6%)	2 (33,3%)	6 (66,7%)	5 (83,3%)
<b>Manutenção</b>	0 (0%)	0 (0%)	1 (11,1%)	0

FONTE: Livro de registro do Laboratório de Micologia Médica e Molecular, UFRN.

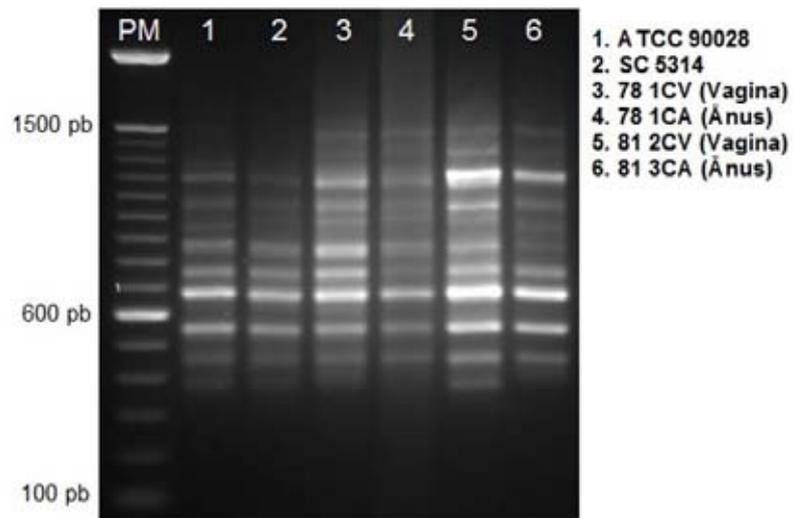
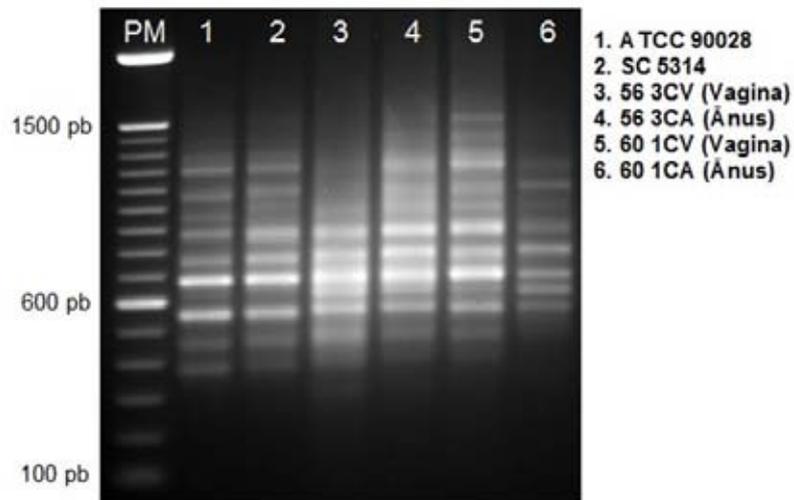
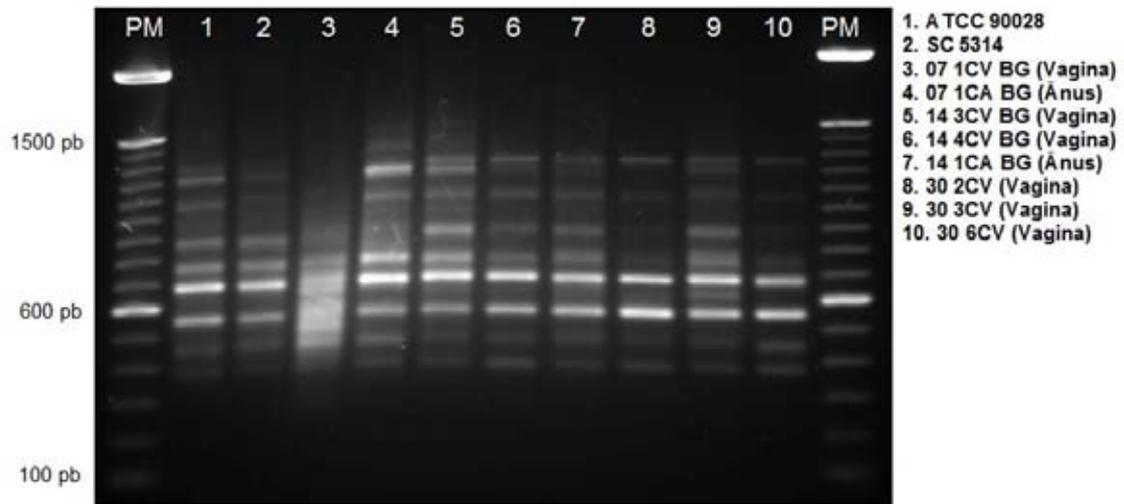
Considerando as situações em que ocorreu substituição completa da cepa vaginal, somente no caso dos isolados vaginais obtidos da paciente 14 houve concordância entre as duas técnicas de genotipagem utilizadas (RAPD microssatélites), caracterizando substituição da cepa infectante de *C. albicans* entre a segunda e a terceira coletas vaginais (isolados 14 2CV e 14 3CV, respectivamente; Fig. 45 e Fig. 46).

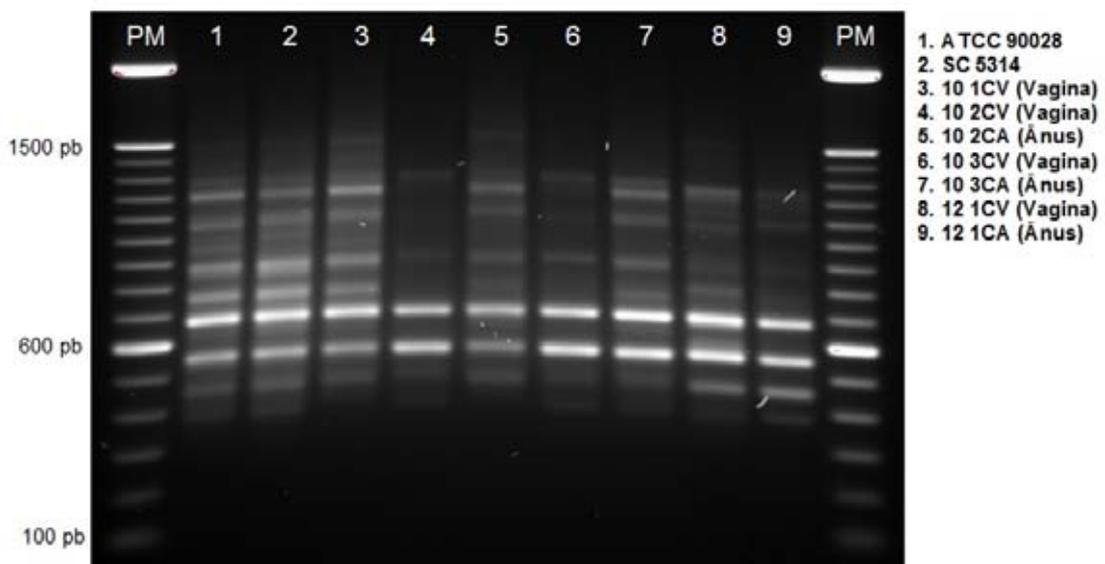
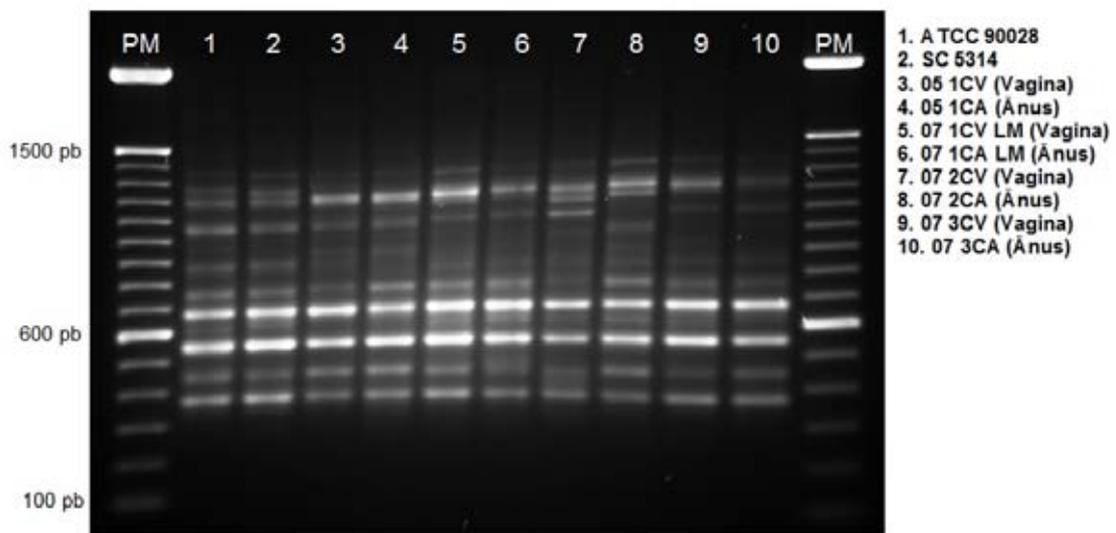
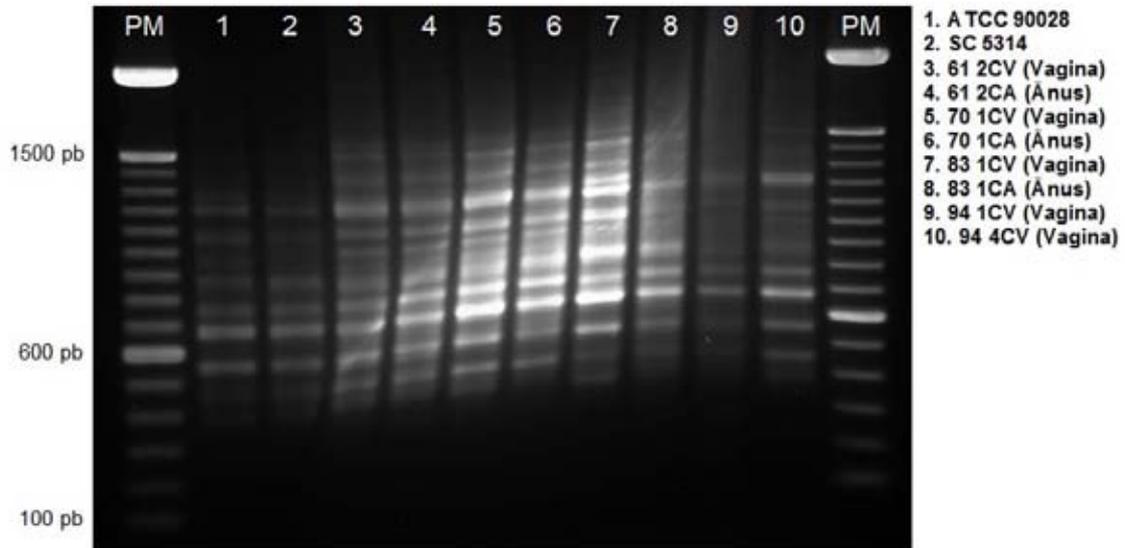


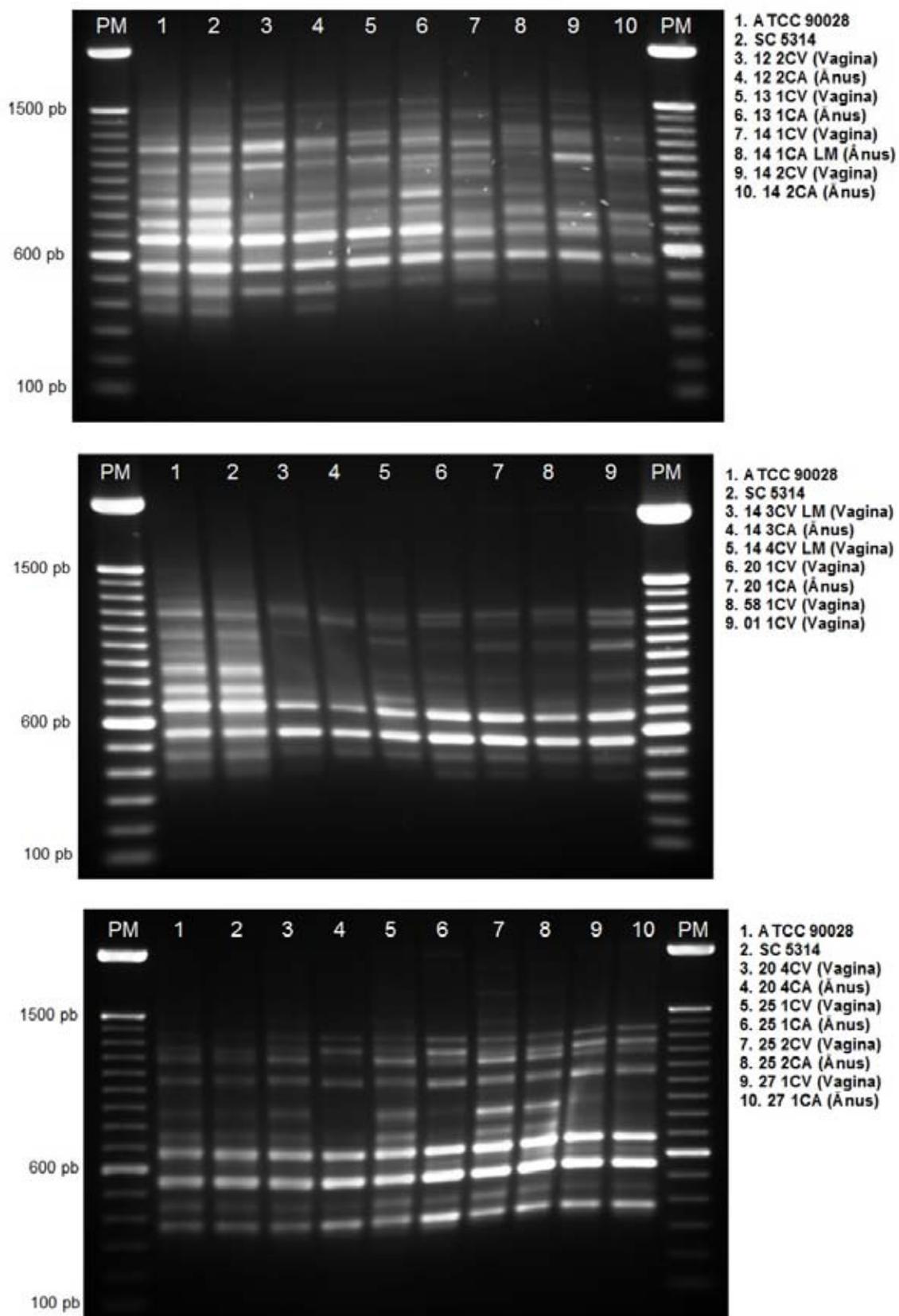




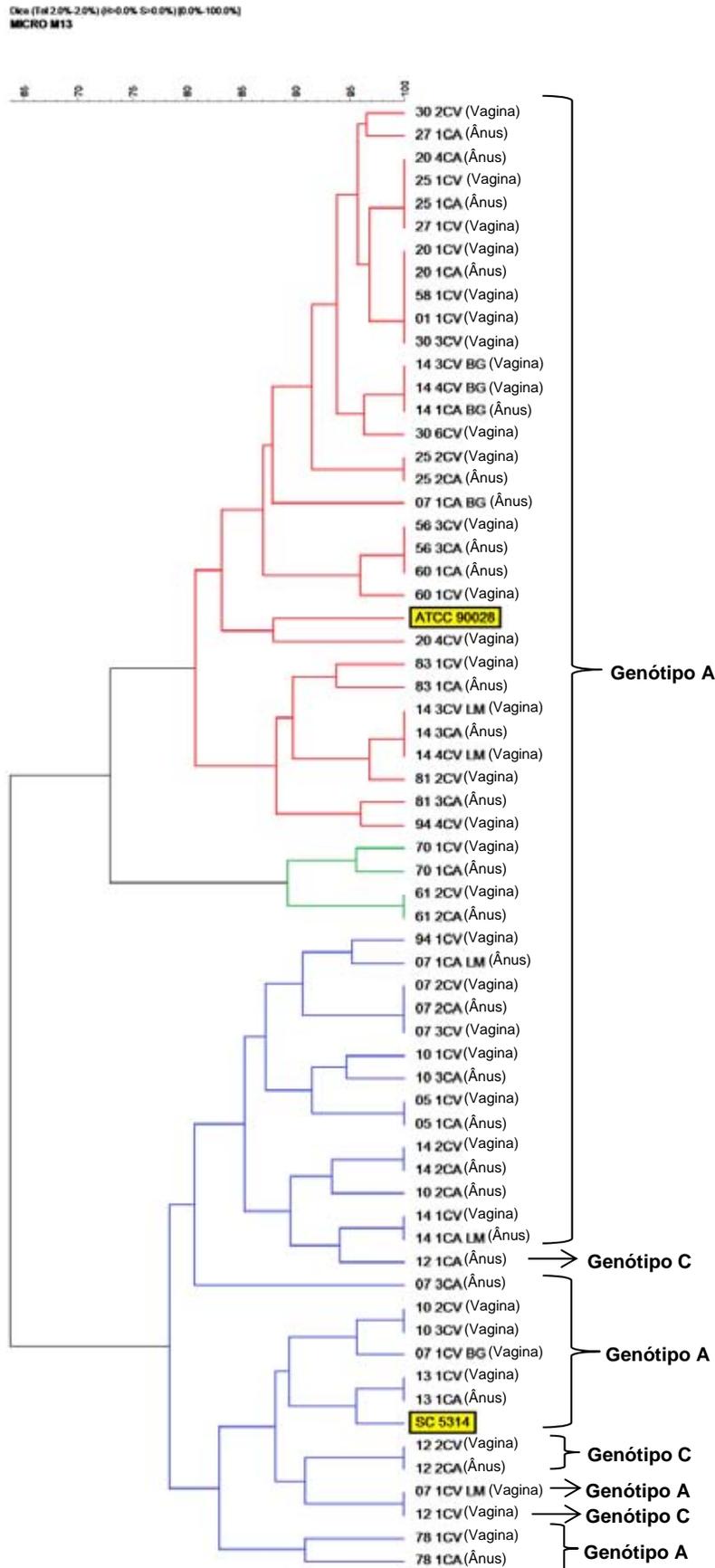
**Figura 43.** Genotipagem por microsatélite dos isolados clínicos de *Candida albicans* incluídos no estudo. PM = Marcador de peso molecular; pb = pares de base. Os números correspondem ao número de registro no banco de micro-organismos do LMMM.



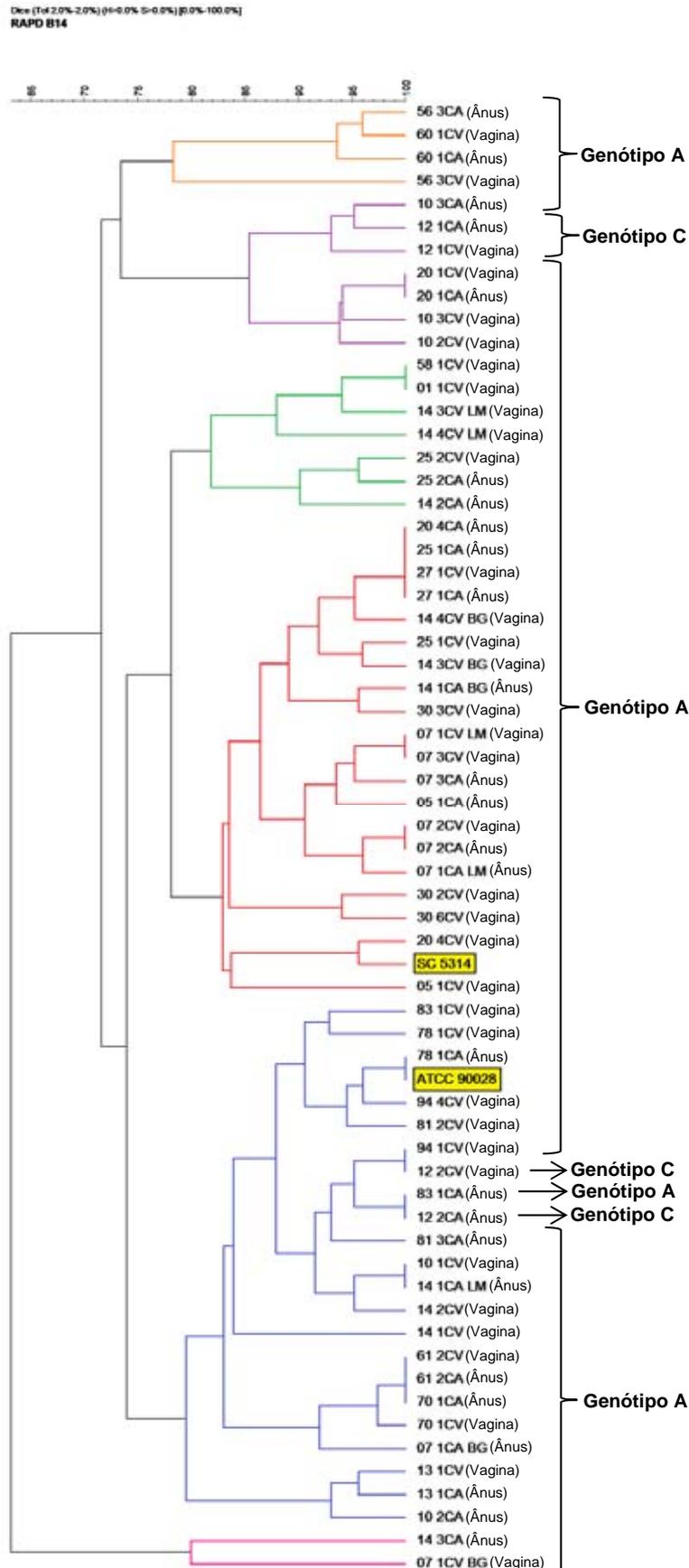




**Figura 44.** Genotipagem por RAPD dos isolados clínicos de *Candida albicans* incluídos no estudo. PM = Marcador de peso molecular; pb = pares de base. Os números correspondem ao número de registro no banco de micro-organismos do LMMM.



**Figura 45.** Dendrograma gerado pelo programa GelComparII pelo método UPGMA referente aos padrões de bandas gerados por amplificação utilizando o “primer” M13. As cores representam os diferentes “clusters”. “Cluster” 1 (vermelho); “cluster” 2 (verde); “cluster” 3 (azul). As cepas destacadas correspondem às cepas de referência SC 5314 e ATCC 90028.



**Figura 46.** Dendrograma gerado pelo programa GelComparII pelo método UPGMA referente aos padrões de bandas gerados por amplificação utilizando o “primer” B14. As cores representam os diferentes “clusters”. “Cluster” 1 (laranja); “cluster” 2 (roxo); “cluster” 3 (verde); “cluster” 4 (vermelho); “cluster” 5 (azul); “cluster” 6 (rosa). As cepas destacadas correspondem às cepas de referência SC 5314 e ATCC 90028.

## 5.9 AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE GENÓTIPOS ABC E FATORES DE VIRULÊNCIA

Com o intuito de verificar a influência dos genótipos apresentados pelos isolados clínicos de *C. albicans* utilizando a técnica de genotipagem ABC sobre os fatores de virulência avaliados (capacidade de aderência a CEBH, atividade de proteinase, morfogênese e biofilme), comparou-se os valores de cada fator de virulência entre isolados pertencentes a genótipos ABC distintos, avaliando-se apenas os isolados obtidos no segundo período de estudo, uma vez que no primeiro período de estudo apenas foram obtidos isolados de *C. albicans* do genótipo A.

Observou-se que os isolados do genótipo A apresentam um IM significativamente superior ao apresentado pelos isolados do genótipo C. Por outro lado, os isolados do genótipo C apresentam uma capacidade de formação de biofilme significativamente superior em relação aos isolados do genótipo A (Tabela 14).

**Tabela 14** – Comparação entre os valores dos fatores de virulência apresentados pelos isolados de *Candida albicans* dos diferentes genótipos ABC obtidos no segundo período de estudo (novembro de 2011 a agosto de 2012)

Fatores de virulência	Genótipo ABC		p valor
	Genótipo A	Genótipo C	
<b>Capacidade de aderência</b>	246 (DP±76)	275 (DP±74)	0,29
<b>Atividade de proteinase</b>	0,030 (DP±0,018)	0,029 (DP±0,003)	0,59
<b>Formação de tubo germinativo após 1h</b>	53,4 % (DP±16,5)	49,0 % (DP±12,5)	0,51
<b>IM após 3h</b>	3,27 (DP±0,42)	2,55 (DP±0,28)	<0,01*
<b>Formação de biofilme</b>	0,252 (DP±0,268)	0,974 (DP±0,761)	0,01*

FONTE: Livro de registro do Laboratório de Micologia Médica e Molecular, UFRN. Nota: IM= Índice morfológico; DP= Desvio padrão; p valor obtido através do teste de Mann-Whitney; \*=p<0,05.

## 6 DISCUSSÃO

O presente trabalho objetivou avaliar atributos de virulência e relacionamento genético entre cepas vaginais e anais de *C. albicans* oriundas de mulheres com CVV esporádica e recorrente ao longo do tempo, entre outros aspectos envolvidos no desenvolvimento da infecção, com o intuito de melhor compreender a patogênese e a fonte de infecção desta enfermidade, tendo em vista que há poucos dados na literatura sobre o tema, principalmente no que diz respeito a isolados anais de *C. albicans* obtidos de pacientes com CVV, havendo também resultados controversos.

Os sinais e sintomas mais prevalentes apresentados pelas pacientes foram a leucorréia (96,3%) e o prurido (70,4%; Tabela 3), condizente com o encontrado em outros estudos relativos à CVV (CONSOLARO et al., 2004; FERRER, 2000; MENDLING, SEEBACHER, 2003; MOREIRA, PAULA, 2006; ROSA, RUMEL, 2004; SCHALLER, 2006).

De acordo com os dados da Tabela 6, os isolados vaginais infectantes observados ao exame direto apresentavam, na maioria dos casos, morfologias relacionadas à filamentação (pseudo-hifas e hifas verdadeiras), demonstrando sua capacidade de transição levedura-hifa, o que era esperado em virtude destas apresentações morfológicas estarem relacionadas ao processo infeccioso, permitindo a invasão tecidual (CONSOLARO et al., 2005; ODDS et al., 1988).

De fato, tem-se associado a presença de estruturas filamentosas à sintomatologia própria de CVV (FERRER, 2000), onde na grande maioria das vezes, pacientes com CVV sintomática apresentam formas filamentosas da levedura ao exame direto (MASHBURN, 2006; FIDEL et al., 2004).

Em todas as amostras vaginais (n=17; 100%) verificou-se a presença de leucócitos (Tabela 6), o que comprova a existência de uma reação inflamatória local, relacionada ao processo infeccioso lesivo da mucosa vaginal que, associada à presença de blastoconídios, mesmo na ausência de pseudo-hifas e hifas verdadeiras, é sugestiva de CVV.

É importante associar os achados microscópicos à presença de sinais ou sintomas para que se tenha o diagnóstico desta enfermidade, bem como

realizar a cultura, tendo em vista que a associação entre exame direto e cultura é o ideal para o diagnóstico desta infecção (OMAR, 2001).

Ao contrário do que era esperado, foi possível constatar a presença de pseudo-hifas, hifas verdadeiras e leucócitos em poucas amostras anais (Tabela 6), sugerindo extensão da infecção genital para a região anal; embora, nas situações em questão, as pacientes não tenham sido questionadas a respeito da presença de sinais ou sintomas relacionados a este sítio anatômico.

Sabe-se que a candidíase genital também pode afetar a região perianal e as dobras crurais das pacientes, causando intertrigo por *Candida* spp. (RUHNKE, 2002). Há relatos de infecção intestinal por espécies de *Candida* (LIN, LI, ZUO, 2011), embora incomuns, sendo mais frequente a ocorrência de infecção perianal por *Candida* spp. (PIRONE et al., 1992). Assim, não é possível descartar a possibilidade de que esteja ocorrendo um processo infeccioso na mucosa anal das pacientes do estudo que apresentaram os achados citados acima.

As amostras de secreção vaginal apresentaram uma contagem de UFC significativamente superior àquela apresentada pelas amostras de secreção anal ( $p < 0,0001$ ; Fig. 10), condizente com a proliferação exacerbada da levedura no sítio de infecção vaginal (BAROUSSE et al., 2001; FIDEL et al., 2004). Conforme esperado, no sítio de colonização anal a carga fúngica foi bem menor, uma vez que a levedura comensal encontra-se em equilíbrio com os demais micro-organismos da microbiota do trato gastrointestinal, de forma análoga ao encontrado por Fidel et al. (2004) no sítio de colonização vaginal assintomática.

Contudo, Barousse et al. (2004) verificaram a presença de alta carga fúngica vaginal em 29% das pacientes adolescentes colonizadas por *Candida* spp. avaliadas no estudo em questão. De fato, segundo Fidel (2007), o limiar referente à carga fúngica a partir da qual a paciente apresenta sinais e sintomas varia bastante entre uma paciente e outra, havendo uma maior tolerância (maior limiar ou carga fúngica) em mulheres que apresentam episódios esporádicos de CVV ou que se encontram apenas colonizadas (sem desenvolver a infecção) em relação àquelas com CVVR.

Nem sempre houve uma tendência à redução na contagem de UFC das amostras de secreção vaginal ao longo das coletas realizadas sequencialmente

em uma mesma paciente (Fig. 11), mesmo após tratamento com antifúngicos e remissão parcial dos sinais e sintomas, o que reflete a ineficácia da terapia em eliminar *C. albicans* da mucosa vaginal completamente, bem como a falta de associação entre a concentração de *Candida* spp. na vagina com o quadro clínico apresentado pela paciente com CVV (CONSOLARO et al., 2004; GIRALDO et al., 2000; LINHARES et al., 2005).

A redução no número de UFC ao longo do tempo, verificada nas amostras sequenciais da paciente 07, associou-se a bom prognóstico, uma vez que esta paciente evoluiu para a cura da CVV, enquanto o aumento no número de UFC, verificado nas amostras sequenciais da paciente 14, associou-se a mau prognóstico, uma vez que esta paciente apresentou retorno de todos os sinais e sintomas característicos de CVV (Fig. 11).

Percebe-se uma tendência à redução na contagem de UFC das amostras de secreção anal ao longo do tempo (Fig. 12), sugerindo que, provavelmente, os isolados anais sofreram a influência dos antifúngicos utilizados pelas pacientes durante esse período.

Além do fluconazol, de aplicação sistêmica, os outros antifúngicos utilizados pelas pacientes foram utilizados topicamente. Contudo, tendo em vista a proximidade anatômica entre vagina e ânus, há a possibilidade de que o antifúngico aplicado no canal vaginal tenha entrado em contato também com a mucosa anal. Além disso, uma porcentagem do miconazol e clotrimazol aplicados na forma farmacêutica de creme vaginal, utilizados por algumas pacientes, apresenta absorção sistêmica, podendo atingir a mucosa anal (BRUNTON, LAZO, PARKER, 2006).

Os isolados recentes de *C. albicans* (obtidos no segundo período de estudo) apresentaram expressão significativamente superior ( $p < 0,05$ ) da maioria dos fatores de virulência em estudo (capacidade de aderência, morfogênese e biofilme) em relação aos isolados estocados em banco de micro-organismos obtidos no primeiro período de estudo (Fig. 15, 27, 28, 36), supondo-se que o longo período de estocagem (de 2003 a 2010) destas amostras possa ter afetado a expressão destes fatores de virulência, com exceção da atividade de proteinase.

De fato, sabe-se que modificações fisiológicas ocasionadas pela instabilidade genética podem ocorrer devido à estocagem de leveduras (BACELO et al., 2009; SMITH, ONIONS, 1983).

Comparando-se os isolados vaginais infectantes com os isolados anais colonizantes quanto à capacidade de expressar os fatores de virulência em estudo (Fig. 15, 20, 27, 28, 36), não se observou diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ), podendo-se inferir que o isolado anal, apesar de se encontrar apenas colonizando, sem causar qualquer prejuízo para o hospedeiro, possui tanta capacidade de expressar os fatores de virulência quanto o isolado vaginal que está causando um processo infeccioso.

Há vários indícios de que os fatores de virulência expressos por *C. albicans* também apresentam papel na colonização de superfícies mucosas. As cepas anais de *C. albicans* provavelmente são bem adaptadas à mucosa da região anal do hospedeiro, uma vez que leveduras do gênero *Candida* podem colonizar o trato gastrointestinal de indivíduos saudáveis, devendo aderir às células epiteliais até mesmo para sobreviverem como comensais (ODDS, 1994a).

As proteinases extracelulares também são secretadas com o objetivo de digerir moléculas proteicas para aquisição de nutrientes para as células microbianas (NAGLIK, CHALLACOMBE, HUBE, 2003), sendo tão fundamentais para a manutenção do micro-organismo comensal quanto para o desencadeamento da infecção (NAGLIK et al., 2004).

Biofilmes de *C. albicans* também são encontrados em superfícies mucosas (DONGARI-BAGTZOGLU et al., 2009; HARRIOTT et al., 2010; HASAN et al., 2009), incluindo a mucosa vaginal (HARRIOTT et al., 2010) e relacionam-se à persistência do micro-organismo, ao passo que apresentam alta resistência aos agentes antifúngicos e aos mecanismos de defesa do hospedeiro (RAMAGE et al., 2001). Além disso, bactérias e fungos da microbiota (incluindo leveduras do gênero *Candida*) podem coexistir no mesmo biofilme, havendo interação desses micro-organismos (DOUGLAS, 2002). Dessa maneira, tem-se sugerido que os biofilmes, além de contribuírem para a infecção, também possam apresentar papel na colonização, embora este tópico não esteja bem elucidado.

Naglik et al. (2006) demonstraram a expressão do gene *HWP1*, que codifica a proteína Hwp1 (“Hyphal Wall Protein” 1), envolvida na morfogênese (NANTEL et al., 2002; SHARKEY et al., 1999; STAAB, FERRER, SUNDSTROM, 1996; STAAB et al., 1999), tanto em amostras de pacientes infectados por *C. albicans* (candidíase oral e vaginal) quanto em amostras de pacientes apenas colonizados por *C. albicans* nestas superfícies mucosas, indicando o papel desta proteína e, portanto, da morfogênese, também em interações benignas de *C. albicans* com o hospedeiro humano (colonização).

Além disso, ressalta-se que os ensaios de virulência foram realizados *in vitro*, em condições que induziram a expressão dos fatores de virulência, como a incubação com albumina bovina para indução da produção de proteinases e a incubação com soro fetal bovino para a indução da filamentação da levedura, em todos os ensaios de virulência, por tempo suficiente para que a levedura possa ter passado a expressar alguns genes necessários à sua virulência.

Assim, justificar-se-ia o fato dos isolados colonizantes anais, no nosso estudo, terem apresentado a mesma capacidade de expressão dos fatores de virulência em relação aos isolados infectantes vaginais, de forma geral.

Contudo, observando-se apenas os isolados pares (cepa vaginal e cepa anal) correspondentes à primeira coleta (em geral antes do início do tratamento com antifúngicos), percebe-se, com algumas exceções, que a cepa vaginal infectante é tão ou mais virulenta que a anal, exceto em relação à porcentagem de formação de tubo germinativo após uma hora de incubação (Fig. 16, 21, 29, 30, 37).

Vários estudos foram realizados com o intuito de elucidar o papel dos fatores de virulência expressos por *C. albicans* na patogênese da CVV, verificando-se alguns resultados controversos, embora indicativos da participação destes fatores no desenvolvimento desta enfermidade.

Em um estudo que comparou isolados vaginais colonizantes obtidos de pacientes assintomáticas com isolados vaginais infectantes obtidos de pacientes com CVV quanto à capacidade de aderência, demonstrou-se que os isolados infectantes foram significativamente mais aderentes que os isolados colonizantes (SEGAL, SOROKA, SCHECHTER, 1984).

Contudo, Trumbore e Sobel (1986) e Kalkanci et al. (2012) não encontraram diferença significativa quando realizaram a mesma comparação,

revelando resultados controversos quanto ao papel da capacidade de aderência ao epitélio para a transição de colonização para infecção. Dados obtidos por Lehrer et al. (1986), utilizando uma cepa mutante com menor capacidade de aderência, sugerem que a aderência à mucosa vaginal pode ser um importante determinante na patogênese da infecção vaginal causada por *C. albicans*, bem como Cheng et al. (2005) e Monroy-perez et al. (2012) demonstraram a expressão de genes codificadores de proteínas relacionadas à adesão, incluindo genes da família *ALS*, em cepas de *C. albicans* isoladas de pacientes com CVV.

Tem sido reportado em literatura que isolados oriundos de pacientes com CVV são significativamente mais proteolíticos do que isolados vaginais oriundos de pacientes colonizadas por *C. albicans*, sem sinais de infecção (AGATENSI et al., 1991; CASSONE et al., 1987; De BERNARDIS et al., 1990; KALKANCI et al. 2012), evidenciando o fato de que as proteinases possuem um papel no processo infeccioso desta enfermidade, constituindo um importante fator de virulência que auxilia na penetração e no dano tecidual (NAGLIK, CHALLACOMBE, HUBE, 2003). Por outro lado, Consolaro et al. (2006) não encontraram diferença estatisticamente significativa na atividade de proteinase de cepas de *C. albicans* isoladas de pacientes apresentando diferentes condições clínicas (colonização, CVV e CVVR). Neste estudo, constatou-se maior produção de tubos germinativos por isolados vaginais infectantes de *C. albicans* em relação a isolados vaginais colonizantes.

Nas últimas duas décadas, tem-se considerado a formação biofilmes de espécies de *Candida* spp. como um importante fator de virulência no estabelecimento de CVVR (THEIN et al., 2009), tendo em vista que as células que fazem parte do biofilme apresentam alta resistência aos agentes antifúngicos e aos mecanismos de defesa do hospedeiro (RAMAGE et al., 2001), o que poderia impedir a completa erradicação das células de *Candida* da mucosa vaginal, levando à recorrência da infecção (DOUGLAS, 2003).

Contudo, Paiva et al. (2012), avaliando a formação de biofilme *in vitro* por isolados de *Candida* spp. obtidos de pacientes com CVV, sugerem que outros fatores poderiam estar envolvidos na patogênese de CVV, corroborando com a teoria de que o potencial de virulência apresentado por espécies de *Candida* é multifatorial.

De forma análoga aos isolados vaginais colonizantes avaliados nos estudos anteriormente citados, esperava-se que os isolados anais, que em geral se encontram apenas colonizando este sítio, sem causar nenhum sintoma ou desconforto, também fossem menos virulentos que os isolados vaginais obtidos de pacientes com sintomas de CVV, o que foi observado em parte no nosso estudo, no início da infecção, embora os isolados anais colonizantes tenham apresentado, de forma geral, a mesma capacidade de expressar os fatores de virulência avaliados que os isolados vaginais infectantes.

Pelo nosso conhecimento, nenhum estudo realizou, ainda, a comparação de isolados vaginais e anais oriundos de pacientes com sintomas de CVV quanto aos fatores de virulência. Portanto, não há como comparar os resultados obtidos no nosso estudo com estudos anteriores da mesma natureza.

Com relação à capacidade de aderência, morfogênese e formação de biofilme dos isolados vaginais obtidos sequencialmente de uma mesma paciente, observa-se uma tendência à diminuição destes atributos de virulência ao longo do tempo (Fig. 17, 31, 32, 38). Por outro lado, a atividade de proteinase dos isolados vaginais sequenciais apresentou comportamento divergente em relação aos demais fatores de virulência avaliados, tendendo a aumentar ao longo do tempo (Fig. 22); talvez em virtude de haver particularidades quanto ao efeito de antifúngicos na atividade proteolítica de *C. albicans*, havendo também a possibilidade do antifúngico aumentar a produção de proteinase dependendo da droga testada e da cepa de *C. albicans* avaliada (COPPING et al., 2005; SCHALLER et al., 2003).

De acordo com os dados das pacientes das quais foi possível a obtenção de informações clínicas ao longo de todas as coletas realizadas (pacientes do segundo período de estudo), a redução na expressão dos fatores de virulência dos isolados vaginais sequenciais acompanha, na maioria das vezes, uma redução nos sinais e sintomas de CVV, bem como o uso de antifúngicos pelas pacientes.

Em um caso específico, relativo aos isolados vaginais sequenciais da paciente 14, a remissão parcial dos sinais e sintomas de CVV acompanhou redução na expressão de todos os fatores de virulência dos isolados correspondentes (14 2CV e 14 3CV). Além disso, quando houve retorno de

todos os sinais e sintomas característicos de CVV, o isolado vaginal correspondente (14 4CV) voltou a apresentar alta capacidade de expressão de todos os fatores de virulência, apesar do uso de antifúngico (nistatina) pela paciente, sugerindo relação entre as manifestações clínicas e expressão dos fatores de virulência.

Observou-se que a capacidade de filamentação após uma hora de incubação foi significativamente superior em isolados de *C. albicans* obtidos quando as pacientes apresentavam mais de dois sinais e sintomas.

Assim, com base nos resultados mencionados anteriormente, sugere-se que há associação entre a capacidade de expressar os diferentes fatores de virulência estudados e a quantidade de manifestações clínicas apresentadas pelas pacientes, principalmente no que diz respeito à capacidade de filamentação da levedura após uma hora de incubação.

No nosso estudo, não se observou diferença significativa na expressão dos fatores de virulência entre isolados de *C. albicans* obtidos de pacientes com CVV esporádica e CVVR, corroborando com os achados da literatura (CONSOLARO et al., 2006; KALKANCI et al., 2012; TRUMBORE, SOBEL, 1986), sugerindo-se que os fatores de virulência expressos por *C. albicans* não são determinantes na instalação de quadro recorrente de CVV.

Não foi possível estabelecer uma associação entre a quantidade de fatores predisponentes apresentada pelas pacientes e a capacidade dos isolados clínicos vaginais de *C. albicans* expressarem os fatores de virulência avaliados (Tabela 9), levando a crer que os fatores predisponentes não exercem influência sobre a expressão dos fatores de virulência *in vitro*.

Quanto ao uso de antifúngicos, também não foi possível estabelecer uma associação significativa entre o uso desses fármacos e a capacidade de expressar os fatores de virulência em estudo (Tabela 10), embora a redução na expressão dos fatores de virulência dos isolados vaginais sequenciais acompanhe, na maioria das vezes, o uso de antifúngicos pelas pacientes. De fato, já foi demonstrada a ação inibitória de diversos antifúngicos e substâncias com potencial terapêutico sobre a aderência e atividade proteolítica de *C. albicans* (BRAGA et al., 1992; ELLEPOLA, SAMARANAYAKE, 1998; HOFLING et al., 2011; IMBERT et al., 2002; WATANABE et al., 2012; SCHALLER et al., 2003; SHREAZ et al., 2012), bem como sobre a capacidade de filamentação de

isolados de *C. albicans* em diversas condições, (NOUMI, SNOUSSI, BAKHROUF, 2010; SHREAZ et al., 2012; WATANABE et al., 2012; YU et al., 2013; ZHANG et al., 2011a; ZHANG et al., 2011b) e também sobre a formação de biofilme de *C. albicans* em superfícies de poliestireno (HSU et al., 2012; MORES et al., 2009; WATANABE et al., 2012; YU et al., 2013; ZHANG et al., 2011a; ZHANG et al., 2011b).

Com base nesses dados e no caso da paciente 14; onde, apesar do uso de antifúngico concomitante, o quarto isolado vaginal (com nítida substituição de genótipo) apresentou alta capacidade de expressar todos os fatores de virulência, sugere-se e que o uso de antifúngicos, por si só, não interfere com a capacidade de expressar os fatores de virulência se não promover a remissão dos sinais e sintomas e, portanto, ser capaz de controlar o processo infeccioso.

Quanto aos isolados anais obtidos sequencialmente de uma mesma paciente, verifica-se uma tendência à redução da capacidade de aderência e de filamentação ao longo do tempo (Fig. 18, 33, 34), talvez devido à influência das drogas antifúngicas utilizadas também sobre os isolados anais.

Avaliando-se a associação entre os fatores de virulência estudados, destaca-se a correlação significativamente positiva entre aderência e biofilme; o que já era esperado, tendo em vista que a aderência às diversas superfícies, inanimadas ou vivas, é o primeiro passo para a formação de biofilme (RAMAGE et al., 2001). Assim, mesmo realizando-se o ensaio de aderência com células epiteliais bucais humanas (CEBH) e o ensaio do biofilme em superfície de poliestireno, foi possível demonstrar a correlação entre estes dois atributos de virulência.

Estudos demonstram que genes relacionados à adesão, pertencentes à família ALS, apresentam aumento de expressão em biofilmes de *C. albicans* (CHANDRA et al., 2001; GREEN et al., 2004). Sabe-se ainda que ALS1 e ALS3, que codificam adesinas, são dois dos principais genes relacionados à formação de biofilmes (NAILIS et al., 2009; NOBILE et al., 2012). De fato, as proteínas que medeiam a adesão às células do hospedeiro e a materiais inertes constituem um dos fatores predominantes no desenvolvimento e manutenção dos biofilmes de *Candida* (CUÉLLAR-CRUZ et al., 2012).

Outra correlação significativamente positiva encontrada foi entre aderência e biofilme em relação à porcentagem de formação de tubo germinativo após uma hora de incubação.

Sabe-se que algumas das proteínas que compõem a parede celular das hifas (Hwp1; Als3) também atuam como adesinas (LIU, FILLER, 2011; LUO et al., 2010). O fator de transcrição Efg1, relacionado à morfogênese, também participa da regulação de genes relacionados à aderência, demonstrando-se que mutantes defeituosos para este fator de transcrição são também menos aderentes (HARRIOTT et al., 2010).

A formação de biofilme por *C. albicans* também está diretamente ligada à sua capacidade de filamentação (morfogênese), tendo em vista que mutantes defeituosos em formar hifas também apresentaram deficiência na formação de biofilme, relacionando-se a capacidade de formação de biofilme aos fatores de transcrição também envolvidos em cascatas de sinalização de morfogênese, como Efg1 (HARRIOTT et al., 2010; LEWIS et al., 2002; RAMAGE et al., 2002) e Cph1 (LEWIS et al., 2002), bem como à proteína Hwp1 (NOBILE et al., 2006a), presente na parede celular das hifas, destacando-se que a relação entre biofilme e morfogênese também foi demonstrada *in vivo*, utilizando um modelo animal de vaginite (HARRIOTT et al., 2010).

Portanto, os dados encontrados em outros estudos corroboram com nossos achados de correlação entre aderência e morfogênese; e entre biofilme e morfogênese, principalmente na primeira hora de filamentação em meio indutor.

Intrigantemente, a atividade de proteinase apresentou correlação fracamente negativa em relação aos demais fatores de virulência, sendo significativa em relação à aderência e ao biofilme, contrariamente ao encontrado em outros estudos (BORG, RUCHEL, 1988; CONSOLARO et al., 2006; EL-MAGHARABI et al., 1990; GARCIA-SANCHEZ et al., 2004; OLLERT et al., 1993; PICHOVA et al., 2001; RAY, PAYNE, 1988). Talvez essa correlação negativa encontrada no nosso estudo se deva ao fato de haver divergências quanto ao efeito de antifúngicos na atividade proteolítica de *C. albicans*, o que também explicaria a tendência da atividade proteolítica do isolados vaginais sequenciais aumentar ao longo do tempo, contrariamente aos demais fatores de virulência.

Demonstrou-se maior expressão dos genes *SAP5*, *SAP6* e *SAP9* em biofilmes de *C. albicans* do que em células planctônicas desta levedura (GARCIA-SANCHEZ et al., 2004), bem como associa-se a expressão de genes da subfamília *SAP4 – SAP6* à formação de hifas em *C. albicans* (HUBE et al., 1994; WHITE, AGABIAN, 1995). Contudo, o ensaio para detecção da atividade de proteinase realizado em nosso estudo induziu principalmente a expressão dos genes da subfamília *SAP1- SAP3*, devido ao baixo pH (3,8) utilizado durante a reação enzimática, possivelmente com maior expressão do gene que codifica a Sap2, a proteinase aspártica mais abundantemente secretada *in vitro*, o que poderia justificar a correlação negativa da atividade de proteinase com a morfogênese e a formação de biofilme.

Apesar da existência da hipótese de que o hospedeiro, e não a cepa de *Candida*, seja o principal determinante no desencadeamento de CVV (BAROUSSE et al., 2005), e levando-se em consideração que a maioria dos isolados da região anal são altamente relacionados ou idênticos geneticamente aos isolados correspondentes encontrados na região vaginal (dados oriundos das técnicas de genotipagem empregadas no nosso estudo), espera-se que a expressão *in vivo* dos fatores de virulência nesses dois sítios seja diferente.

Essa expressão dos fatores de virulência se deveria à tentativa da levedura em sobreviver a este ambiente inóspito, buscando aderir ao epitélio, adquirir nutrientes através da quebra de proteínas e lipídios e invadir o tecido do hospedeiro, além de se defender da resposta imunológica do mesmo (ODDS, 1994a).

Nossos resultados sugerem que a expressão dos fatores de virulência é importante na patogênese de CVV, na medida em que demonstrou-se associação dos atributos de virulência avaliados com as manifestações clínicas apresentadas pelas pacientes, bem como a cepa infectante vaginal tendeu a ser tão ou mais virulenta que a cepa colonizante anal no início da infecção, em geral antes do tratamento com antifúngicos.

Contudo, a capacidade de expressar esses atributos de virulência não parece ser determinante na transição de colonização para infecção, tendo em vista que os isolados colonizantes anais foram capazes de expressar os diversos fatores de virulência avaliados tanto quanto os isolados infectantes vaginais, levando a crer que fatores próprios do ambiente vaginal (pH,

microbiota, células epiteliais da mucosa, hormônios, resposta imunológica, entre outros) sejam os responsáveis por desencadear a maior expressão dos fatores de virulência e a transição colonização/infecção.

Não obstante, torna-se importante mencionar que a avaliação de apenas quatro fatores de virulência *in vitro* pode não ser suficiente para representar a complexa interação de todos os fatores de patogenicidade *in vivo* entre si e sua interação com o sistema imune e diferentes nichos do hospedeiro, apresentando diferentes condições. Estudos mais complexos, incluindo um maior número de isolados, bem como utilizando modelos de CVV *in vivo*, poderiam ajudar no esclarecimento do processo de transição de colonização para infecção em candidíase vulvovaginal (CVV).

No nosso estudo, observou-se através da técnica de genotipagem ABC (MCCULLOUGH, CLEMONS e STEVENS, 1999a), que o genótipo A foi o mais prevalente (93,6%) dentre os 62 isolados vaginais e anais, enquanto apenas 6,4% das cepas eram do genótipo C e o genótipo B não foi encontrado (Tabela 11).

Em outros estudos avaliando isolados clínicos de *C. albicans* oriundos de diversos sítios anatômicos (incluindo cepas vaginais) e de regiões geográficas distintas através de genotipagem ABC, verifica-se que o genótipo A é o mais prevalente (ADACHI et al., 2009; BALABAN et al., 2007; IWATA et al., 2006; KARAHAN et al., 2012; MILLAR et al., 2002; ODDS et al., 2006; ODDS et al., 2007; TAMURA et al., 2001), corroborando com a teoria de que o genótipo A de *C. albicans* é mundialmente mais frequente, independente do sítio ou região geográfica de onde foi isolado, embora haja exceções, como no estudo de Sardi et al. (2011); e possam haver variações geográficas nas prevalências dos genótipos A, B e C (MCCULLOUGH, CLEMONS, STEVENS, 1999b).

No nosso estudo, nenhum dos isolados vaginais ou anais foi identificado como *C. dubliniensis* através de biologia molecular (Tabela 11), havendo 100% de concordância com os resultados obtidos pela triagem fenotípica realizada para *C. dubliniensis*, o que demonstra a confiabilidade dos métodos fenotípicos utilizados, embora apenas uma cepa de *C. dubliniensis* (CBS 7987) tenha sido avaliada.

O isolamento de *C. dubliniensis* de sítio vaginal é pouco frequente, sendo esta levedura encontrada principalmente causando candidíase oral em pacientes portadores de HIV (SULLIVAN, COLEMAN, 1998), embora haja alguns relatos de isolamento de *C. dubliniensis* de amostras vaginais (ACIKGOZ et al., 2004; AL-SWEIH et al., 2005; CHRYSSANTHOU, FERNANDEZ e PETRINI, 2007; ILKIT et al., 2007; ODDS, VAN NUFFEL e DAMS, 1998; US e CENGIZ, 2006).

No estudo de Fan et al. (2008), investigando polimorfismos no locus CAI de microssatélite, verificou-se a ocorrência de genótipos dominantes, apresentados pela maioria dos isolados vaginais de *C. albicans* obtidos de pacientes com CVV. Em estudo anterior utilizando a mesma metodologia (LI, BAI, 2007), demonstrou-se que os genótipos vaginais dominantes eram pouco frequentes em isolados de *C. albicans* oriundos de outros sítios anatômicos, supondo-se que deve haver genótipos de *C. albicans* com tropismo para a vagina.

Os resultados obtidos no estudo de Ge et al. (2012), utilizando a técnica de MLST (“Multilocus Sequence Typing”) e investigando polimorfismos no locus CAI de microssatélite, sugerem associação significativa de genótipos de *C. albicans* específicos e geneticamente relacionados com CVV na China, corroborando com os resultados de outros estudos chineses (FAN et al. 2008; LI, BAI, 2007; LI et al., 2008).

Ge et al. (2012) verificaram que as cepas de *C. albicans* oriundas de outros países, também isoladas de pacientes com CVV, apresentavam genótipos mais distribuídos e poucas compartilhavam o mesmo clado dominante dos isolados vaginais chineses, levando a crer que a distribuição de genótipos em CVV varia conforme a localização geográfica.

Em estudo realizado na Índia, utilizando a técnica de Southern blot, 95% dos isolados vaginais de *C. albicans* obtidos de diferentes pacientes com CVV foram classificados como não relacionados geneticamente (LATTIF, 2011), diferindo do encontrado em outros estudos que sugerem genótipos vaginopáticos dominantes.

No nosso estudo, assim como no de Odds et al. (2006), Jacobsen et al. (2008) e Emmanuel et al. (2012), a maioria das cepas de *C. albicans* obtidas de amostras vaginais apresentou o genótipo A, indicando que este genótipo é,

possivelmente, o mais prevalente em pacientes com CVV, de forma análoga aos genótipos dominantes descritos em estudos anteriores (FAN et al., 2008; GE et al., 2012; LI, BAI, 2007; LI et al., 2008).

Observando nossos resultados através das técnicas de genotipagem por microssatélites e RAPD, encontramos genótipos bastante distintos causando CVV, embora a maioria dos isolados vaginais tenham se agrupado em apenas dois “clusters”, em ambas as técnicas (Fig. 45 e Fig. 46), sugerindo a predominância de determinados genótipos de *C. albicans* (genótipos dominantes) causando CVV, corroborando com os resultados obtidos nos estudos realizados na China (FAN et al., 2008; GE et al., 2012; LI, BAI, 2007; LI et al., 2008).

Observa-se, através da técnica de genotipagem ABC, que uma mesma paciente apresenta apenas um genótipo tanto no sítio vaginal quanto no sítio anal e ao longo de coletas realizadas sequencialmente na vagina e no ânus, não havendo substituição da cepa ao longo do tempo (Fig. 42).

Chaves, Santos e Colombo (2012), avaliando grupos de pacientes de um hospital terciário em São Paulo (Brasil) que participaram de um estudo de vigilância, onde várias amostras de diversos sítios anatômicos foram avaliadas, observaram que pacientes que não desenvolveram candidemia eram colonizados por mais de um genótipo ABC de *C. albicans*, havendo substituição de cepa em alguns casos; enquanto pacientes que desenvolveram candidemia apresentavam colonização multifocal por um único genótipo (A ou B) persistente, sugerindo-se que a presença de uma cepa única dominante e bem adaptada, como observado no nosso estudo, pode aumentar o risco de transição de comensalismo para infecção.

Odds et al. (2006) observaram, dentre 6 isolados vaginais e um isolado de colo uterino, manutenção do genótipo ABC da cepa ao longo de coletas sequenciais da mesma paciente, embora poucos isolados tenham sido avaliados, corroborando com os resultados do nosso estudo relativos à genotipagem ABC.

Sampaio et al., (2003) encontraram 100% de concordância entre os genótipos apresentados por isolados vaginais e isolados anais simultaneamente obtidos de pacientes com CVVR, analisando polimorfismos no locus CAI de microssatélite.

Shi M. et al. (2007) verificaram, utilizando marcadores rápidos de microssatélites em loci de genes conservados (*CDC3*, *EF3*, *HIS3*), que 80% das pacientes com CVV apresentavam a mesma cepa de *C. albicans* na região genital e no reto, enquanto Lin, Li e Zuo (2011) constataram, em 92% das situações, alta homologia entre isolados vaginais e intestinais de *Candida* spp. oriundos de pacientes com CVV, utilizando PCR da região ITS e a técnica de RAPD.

Nossos resultados obtidos através das técnicas de genotipagem por microssatélites e RAPD também demonstram que, na maioria das situações (70,8% e 62,5%, respectivamente), os isolados vaginais apresentam alta similaridade genética ou foram idênticos aos isolados anais correspondentes (Tabela 12), embora em menor proporção em relação ao encontrado nos estudos anteriormente citados.

Assim, sugere-se que, provavelmente, as cepas patogênicas vaginais são mantidas no reservatório anal que, na maioria das situações, constitui a fonte da infecção, podendo ocorrer microevolução para adaptação ao ambiente vaginal.

Estudo realizado por HOLANDA et al. (2007) mostrou que pacientes colonizadas na região anal por *C. albicans* apresentaram cerca de 5 vezes mais chance de desenvolver CVV, sugerindo que a persistência de *C. albicans* na mucosa anal possa estar relacionada com a transição do comensalismo à infecção, bem como Lin, Li e Zuo (2011) verificaram que a taxa de recorrência de CVV complicada foi maior em pacientes que também apresentavam *Candida* spp. na mucosa intestinal.

Uma hipótese seria que ocorra contaminação do ânus para a vagina, tendo como fonte a microbiota normal do próprio intestino (FIDEL, SOBEL, 1996), tal como ocorre nas infecções urinárias causadas por *Escherichia coli*, onde a bactéria oriunda do trato gastrointestinal ascende pelas vias urinárias, ocasionando infecção do trato urinário (GUIDONI, TOPOROVSKI, 2001).

Contudo, outras fontes de infecção vaginal provavelmente estão envolvidas, dada a comprovação, pelos resultados do nosso estudo, da existência de cepas diferentes, não relacionadas geneticamente, causando a infecção vaginal e colonizando o ânus, em algumas situações (Tabela 12),

corroborando com outros estudos que apontam a possibilidade de transmissão sexual de CVV (SCHROPPEL et al., 1994; LI et al., 2008).

Vários estudos avaliaram o relacionamento genético entre isolados vaginais de *Candida* spp. obtidos sequencialmente de pacientes com CVVR, verificando a ocorrência de três situações: manutenção, microevolução ou substituição da cepa vaginal ao longo do tempo (AMOURI et al. 2012; CHONG et al. 2003; CHONG et al. 2007; LOCKHART et al. 1996; SAMPAIO et al. 2003; SAMPAIO et al. 2005), o que também foi observado no nosso estudo (Tabela 13).

Nos estudos de Sampaio et al. (2003), analisando polimorfismos no locus CAI de microssatélite e de Sampaio et al. (2005), que investigou cinco loci de microssatélites (CAI, CAIII, CAV, CAVI, CAVII), observou-se maior prevalência de manutenção da cepa, enquanto nos estudos de Chong et al. (2003) e Chong et al. (2007), através de técnicas de RAPD com “primers” distintos, bem como no estudo de Lockhart et al. (1996), utilizando a técnica de “Southern blot”, verificou-se maior prevalência de microevolução da cepa ao longo do tempo, corroborando com os resultados do nosso estudo, no qual verificou-se, através das técnicas de genotipagem por microssatélites e RAPD, tendência à microevolução das cepas vaginais isoladas de uma mesma paciente ao longo do tempo (Tabela 13).

Contudo, Amouri et al. (2012), investigando 3 loci de microssatélites (CAI, CAIII, CAIV), observaram maior prevalência de substituição da cepa ao longo do tempo, contrariando os resultados encontrados nos estudos citados anteriormente, embora tenham sido empregadas diferentes técnicas de genotipagem, bem como os estudos foram realizados em diferentes regiões geográficas.

Segundo Lockhart et al. (1996), uma única cepa de *C. albicans* geralmente prevalece em diferentes localizações extragenitais de pacientes com CVVR e nos parceiros sexuais das mesmas, sendo mantida em infecções sequenciais. Diferentes “subcepas” do clone estabelecido dominam de maneira aparentemente randômica, o que explicaria a ocorrência de microevolução em um curto espaço de tempo, até mesmo em uma semana, como observado no nosso estudo.

Schroppel et al. (1994), utilizando a técnica de “Southern blot”, também observou a instabilidade genética das cepas de *C. albicans* que causam CVVR, sugerindo que o tratamento com antifúngicos pode selecionar variantes da cepa infectante anterior ou culminar em substituição por uma cepa geneticamente não relacionada. No mesmo sentido, Sampaio et al. (2005) observaram perda de heterozigose relacionada à exposição das cepas de *C. albicans* ao fluconazol durante tratamento das pacientes.

No nosso estudo, a maioria das pacientes realizou tratamento com antifúngicos ao longo da obtenção dos isolados vaginais sequenciais; o que, aliado aos resultados obtidos em estudos anteriores, sugere que o uso de antifúngicos pelas pacientes tenha papel importante nas alterações genéticas das cepas infectantes vaginais ao longo do tempo.

Verificaram-se, no nosso estudo, resultados divergentes entre as duas técnicas de genotipagem (microssatélites e RAPD) empregadas quanto aos isolados anais obtidos sequencialmente da mesma paciente, observando-se tendência à substituição da cepa anal através da técnica de RAPD e tendência à microevolução da cepa anal através da técnica de microssatélites (Tabela 13).

Pelo nosso conhecimento, nenhum estudo avaliou o relacionamento genético de isolados anais sequencialmente obtidos de pacientes com CVV. No entanto, considerando os estudos de Jacobsen et al. (2008) e Ge et al. (2012), que demonstram maior heterogeneidade de genótipos em sítios de colonização em relação a sítios de infecção (incluindo CVV), justifica-se a maior variação genética da cepa anal colonizante ao longo do tempo em relação à cepa vaginal infectante encontrada em nosso estudo.

Lian et al. (2004), utilizando técnica de RAPD, não observaram diferença significativa entre os genótipos apresentados pelos isolados de *C. albicans* obtidos de diferentes grupos de pacientes (com CVVR, CVV esporádica e colonização), indicando não haver associação entre o genótipo apresentado pela cepa de *C. albicans* e a condição clínica da paciente, corroborando com os resultados encontrados no nosso estudo, onde a maioria dos “clusters” diferenciados por ambas as técnicas de genotipagem utilizadas (microssatélites e RAPD) incluíram tanto isolados obtidos de pacientes com CVV esporádica quanto de pacientes com CVVR (Fig. 45 e Fig. 46).

Contrariamente, Chong et al. (2007) observaram que a similaridade genética entre os isolados de *Candida* spp. obtidos de grupos de pacientes com CVVR e CVV esporádica foi relativamente baixa, indicando a possível existência de genótipos relacionados à condição clínica.

No nosso estudo, tanto os isolados de *C. albicans* obtidos de pacientes com CVVR quanto os isolados obtidos de pacientes com CVV esporádica apresentaram genótipos bem distribuídos entre os “clusters” gerados pelas técnicas de genotipagem empregadas (microssatélites e RAPD), diferentemente dos resultados obtidos em outros estudos, que encontraram maior ou menor heterogeneidade genética em isolados de *C. albicans* de pacientes com CVVR em relação a isolados obtidos de pacientes com CVV esporádica (AMOURI et al. 2012; FAN et al. 2008; CHONG et al. 2003).

Observaram-se algumas associações entre os fatores de virulência estudados e os genótipos ABC dos isolados de *C. albicans* inclusos no estudo. Contudo, poucos isolados do genótipo C foram obtidos (apenas quatro), devendo-se confirmar as associações encontradas com um maior número de cepas de *C. albicans* pertencentes a estes genótipos, para maior confiabilidade dos resultados.

Em outros estudos (SARDI et al., 2011; SUGITA et al., 2002), verificaram-se diferenças na expressão de diversos fatores de virulência entre os genótipos de *C. albicans* (A, B, C), incluindo a atividade de proteinase, atributo avaliado no presente estudo, embora as diferenças encontradas sempre envolvessem o genótipo B, não encontrado no nosso estudo.

Observou-se menor diferenciação das cepas do nosso estudo pela técnica de genotipagem ABC em relação às outras metodologias empregadas (microssatélites e RAPD). De fato, a técnica de genotipagem ABC permite diferenciar *C. albicans* em apenas três genótipos distintos, sendo relativamente pouco discriminatória em relação a outras metodologias (microssatélites, RAPD, MLST).

As técnicas de microssatélites e RAPD utilizam “primers” para diferentes alvos no genoma de *C. albicans* e, portanto, podem apresentar diferentes resultados para os mesmos isolados, o que se verificou no nosso estudo em algumas situações. No caso de infecções fúngicas, nenhuma técnica específica

tornou-se o método dominante. De fato, cada método tem suas vantagens e desvantagens (SOLL, 2000).

Assim, ressalta-se a importância de se utilizar várias técnicas de genotipagem para avaliação do relacionamento genético entre isolados clínicos de *C. albicans*, objetivando obter resultados mais confiáveis.

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

- Tanto o exame direto quanto a cultura são importantes no diagnóstico micológico da CVV por *C. albicans*. Ressalta-se que a proliferação da levedura e a transição levedura-hifa são importantes no estabelecimento da CVV;
- Houve grande variabilidade dos isolados de *C. albicans* quanto à expressão dos diferentes fatores de virulência *in vitro*;
- Observa-se uma tendência à diminuição da capacidade de aderência, morfogênese e formação de biofilme do isolado vaginal infectante ao longo do tempo;
- Nossos resultados sugerem que a expressão dos fatores de virulência é importante na patogênese de CVV, contudo não parece ser determinante na transição de colonização para infecção;
- Sugere-se que os fatores de virulência expressos por *C. albicans* não são determinantes na instalação de quadro recorrente de CVV;
- Houve correspondência na expressão da capacidade de aderência, morfogênese e formação de biofilme dos isolados de *C. albicans*, indicando que estes fatores de virulência estão correlacionados;
- O genótipo A demonstra ser dominante em isolados vaginais e anais de mulheres com CVV;
- Verifica-se maior prevalência de microevolução das cepas de *C. albicans* no ambiente vaginal, corroborando com a hipótese de que existam “subcepas” do clone estabelecido, as quais dominam de maneira aparentemente randômica ao longo do tempo;
- Sugere-se que as cepas patogênicas vaginais são mantidas no reservatório anal que, na maioria das situações, constitui a fonte da infecção, podendo ocorrer microevolução no ambiente vaginal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACIKGOZ, Z. C. et al. Prevalence of *Candida dubliniensis* among the stored vaginal *Candida* isolates in a Turkish hospital. *Mycoses* 47, 393–396, 2004.

ADACHI, H. et al. Genotyping of *Candida albicans* by Fragment Analysis of Microsatellites Combined with 25S rDNA and RPS-based Strategies. *J. Med. Mycol.* 50: 167-174, 2009.

AGATENSI, L. et al. Vaginopathic and proteolytic *Candida* species in outpatients attending a gynecology clinic. *J. Clin. Pathol* 44: 826–830, 1991.

AL-SWEIH, N. et al. Prevalence of *Candida dubliniensis* among germ tube-positive *Candida* isolates in a maternity hospital in Kuwait. *Mycoses* 48, 347–351, 2005.

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* 43(5): 319-327, 2007.

ALVES, S. H. et al. Hypertonic sabouraud broth as a simple and powerful test for *Candida dubliniensis* screening. *Diagn Microbiol Infect Dis* 43: 85-6, 2002.

AMOURI, I. et al. Microsatellite analysis of *Candida* isolates from recurrent vulvovaginal candidiasis. *J Med Microbiol*. 2012.

AULER, M. E. et al. Contribuição do biofilme na candidíase vulvovaginal recorrente. In: Congresso Brasileiro de Micologia, 2001, Águas de Lindóia (São Paulo), p. 109.

BACHEWICH, C.; THOMAS, D. Y.; WHITEWAY, M. Depletion of a polo-like kinase in *Candida albicans* activates cyclase-dependent hyphal-like growth. *Mol. Biol. Cell* 14: 2163–2180, 2003.

BACELO K. L. et al. Biotype stability of *Candida albicans* isolates after culture storage determined by randomly amplified polymorphic DNA and phenotypical methods. *Mycoses* 53: 468–474, 2009.

BAEK, Y. U.; MARTIN, S. J.; DAVIS, D. A. Evidence for novel pH-dependent regulation of *Candida albicans* Rim101, a direct transcriptional repressor of the cell wall  $\beta$ -glycosidase Phr2. *Eukaryot. Cell* 5: 1550–1559, 2006.

BAILEY, D. A. et al. The *Candida albicans* HYR1 gene, which is activated in response to hyphal development, belongs to a gene family encoding yeast cell wall proteins. *J. Bacteriol.* 178: 5353–5360, 1996.

BAILLIE, G. S.; DOUGLAS, L. J. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *J Med Microbiol* 48: 671-679, 1999.

BALABAN, N. et al. The relationship between *Candida albicans* 25S intron genotypes and antifungal susceptibilities. Mikrobiyol Bul. 41(2): 245-51, 2007.

BARCHIESI, F. et al. Genotypic identification of sequential *Candida albicans* isolates from AIDS patients by polymerase chain reaction techniques. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 16: 601–605, 1997.

BAROUSSE M. M. et al. Growth inhibition of *Candida albicans* by human vaginal epithelial cells. J Infect Dis 184: 1489-1493, 2001.

BAROUSSE, M. M. et al. Vaginal yeast colonisation, prevalence of vaginitis, and associated local immunity in adolescents. Sex Transm Infect 80:48–53, 2004.

BAROUSSE, M. M. et al. Vaginal Epithelial Cell Anti-*Candida albicans* Activity Is Associated with Protection against Symptomatic Vaginal Candidiasis. Infection and Immunity 73(11): 7765 – 7767, 2005.

BATES, S. et al. Outer chain N-glycans are required for cell wall integrity and virulence of *Candida albicans*. J Biol Chem 281:90-8, 2006.

BAUMGARTNER, C.; FREYDIERE, A. M.; GILLE, Y. Direct identification and recognition of yeast species from clinical material by using *albicans* ID and CHROMagar *Candida* plates. J Clin Microbiol 34: 454-6, 1996.

BERMAN, J.; SUDBERY, P. E. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. Nat. Rev. Genet. 3: 918-930, 2002.

BORG, M.; RUCHEL, R. Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic *Candida* spp during experimental infection of oral mucosa. Infect Immun 56: 626–631, 1988.

BOTTEREL, F. et al. Analysis of microsatellite markers of *Candida albicans* used for rapid typing. J. Clin. Microbiol. 39: 4076–4081, 2001.

BOUCHER, H. et al. A novel group I intron in *Candida dubliniensis* is homologous to a *Candida albicans* intron. Gene 180: 189–196, 1996.

BOUGNOUX, M. E.; MORAND, S.; D'ENFERT, C. Usefulness of multilocus sequence typing for characterization of clinical isolates of *Candida albicans*. J. Clin. Microbiol. 40: 1290–1297, 2002.

BRAGA, P. C. et al. Effects of subinhibitory concentrations of ciclopirox on the adherence of *Candida albicans* to human buccal and vaginal epithelial cells. Arzneimittelforschung 42(11): 1368-71, 1992.

BRETAGNE, S. et al. Microsatellite polymorphism in the promoter sequence of the elongation factor 3 gene of *Candida albicans* as the basis for a typing system. J. Clin. Microbiol. 35: 1777–1780, 1997.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. Goodman & Gilman: Bases Farmacológicas da Terapêutica. 11<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006. 1821 p.

CAO, Y. Y. et al. cDNA microarray analysis of differential gene expression in *Candida albicans* biofilm exposed to farnesol. Antimicrob Agents Chemother 49: 584-589, 2005.

CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends Microbiol 9: 327-35, 2001.

CALDERONE, R.; GOW, N. A. R. Host Recognition by *Candida* Species. In: CALDERONE, R. Candida and Candidiasis. Washington D. C.: ASM Press, 2002. p 67 – 86.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. A. The damage-response framework of microbial pathogenesis. Nature Rev. Microbiol. 1: 17–24, 2003.

CASALI, A. K. et al. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. FEMS Yeast Res 3: 405-15, 2003.

CASSONE, A. et al. Evidence for a correlation between proteinase secretion and vulvovaginal candidosis. J. Infect. Dis. 156: 777–783, 1987.

CHANDRA, J. et al. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture and drug resistance. J Bacteriol 183: 5385 - 5394, 2001.

CHAVES, G. M. et al. *Candida albicans* GRX2, encoding a putative glutaredoxin, is required for virulence in a murine model. Genet Mol Res. 6(4): 1051-1063, 2007.

CHAVES, G. M.; SANTOS, F. P.; COLOMBO, A. L. The persistence of multifocal colonisation by a single ABC genotype of *Candida albicans* may predict the transition from commensalism to infection. Mem Inst Oswaldo Cruz 107(2): 198-204, 2012.

CHENG, G. et al. Comparison between *Candida albicans* Agglutinin-Like Sequence Gene Expression Patterns in Human Clinical Specimens and Models of Vaginal Candidiasis. Infection and immunity 73(3): 1656–1663, 2005.

CHENG, G.; YEATER, K. M.; HOYER, L. L. Cellular and molecular biology of *Candida albicans* estrogen response. Eukaryotic Cell 5: 180–191, 2006.

CHOI, G. H. et al. Molecular analysis and overexpression of the gene encoding endothiapsin, an aspartic protease from *Cryphonectria parasitica*. Gene 125: 135–141, 1993.

CHONG, P. P. et al. Genetic relatedness of *Candida* strains isolated from women with vaginal candidiasis in Malaysia. Journal of Medical Microbiology 52: 657–666, 2003.

CHONG, P. P. et al. Genotyping and drug resistance profile of *Candida* spp. in recurrent and one-off vaginitis, and high association of non-albicans species with non-pregnant status. Infection, Genetics and Evolution 7: 449–456, 2007.

CHRYSSANTHOU, E.; FERNANDEZ, V.; PETRINI, B. Performance of commercial latex agglutination tests for the differentiation of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* in routine diagnostics. APMIS 115: 1281–1284, 2007.

CLEMONS, K. V. et al. Comparative analysis of genetic variability among *Candida albicans* isolates from different geographic locales by three genotypic methods. J Clin Microbiol. 35: 1332–1336, 1997.

COLEMAN, D. C. et al. Candidiasis: the emergence of a novel species, *Candida dubliniensis*. AIDS 11(5): 557-67, 1997.

CONSOLARO, M. E. L. et al. Correlation of *Candida* species and symptoms among patients with vulvovaginal candidiasis in Maringá, Paraná, Brazil. Rev Iberoam Micol 21: 202-205, 2004.

CONSOLARO, M. E. L. et al. Vulvovaginal candidiasis is associated with the production of germ tubes by *Candida albicans*. Mycopathol 159: 501-07, 2005.

CONSOLARO, M. E. L. et al. Effect of pepstatin A on the virulence factors of *Candida albicans* strains isolated from vaginal environment of patients in three different clinical conditions. Mycopathologia 162: 75–82, 2006.

COPPING, V. M. et al. Exposure of *Candida albicans* to antifungal agents affects expression of *SAP2* and *SAP9* secreted proteinase genes. J Antimicrob Chemother 55: 645-54, 2005.

CORREIA, A. et al. Study of molecular epidemiology of candidiasis in Portugal by PCR fingerprinting of *Candida* clinical isolates. J. Clin. Microbiol. 42: 5899–5903, 2004.

CORSELLO, S. et al. An epidemiological survey of vulvovaginal candidiasis in Italy. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 110: 66-72, 2003.

COSTERTON, J. W. et al. Microbial biofilms. Rev. Microbial. 49:711-45, 1995.  
COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 284(21): 1318–1322, 1999.

CUÉLLAR-CRUZ M. et al. *Candida* species: new insights into biofilm formation. Future Microbiol. 7(6): 755–771, 2012.

CUTLER, J. E. Putative virulence factors of *Candida albicans*. Annu. Rev. Microbiol. 45: 187–218, 1991.

DALLE, F. et al. Comparative genotyping of *Candida albicans* bloodstream and nonbloodstream isolates at a polymorphic microsatellite locus. J. Clin. Microbiol. 38: 4554–4559, 2000.

DAN, M.; POCH, F.; LEVIN, D. High rate of vaginal infections caused by non-*C. albicans* species among asymptomatic women. Medical Mycology 40: 383-86, 2002.

DA SILVA DANTAS, A. et al. Thioredoxin regulates multiple hydrogen peroxide-induced signaling pathways in *Candida albicans*. Mol. Cell. Biol. 30: 4550–4563, 2010.

DAVIES, D. G.; MARQUES, C. N. A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. J. Bacteriol. 191(5), 1393–1403, 2009.

DE BERNARDIS, F. et al. Evidence for a role for secreted aspartate proteinase of *Candida albicans* in vulvovaginal candidiasis. J. Infect. Dis. 161:1276–1283, 1990.

DE BERNARDIS, F. et al. High aspartyl proteinase production and vaginitis in human immunodeficiency virus-infected women. J. Clin. Microbiol. 37: 1376–1380, 1999.

DE BERNARDIS, F.; SULLIVAN, P.A.; CASSONE, A. Aspartyl proteinases of *Candida albicans* and their role in pathogenicity. Medical Mycology 39: 303-313, 2001.

DE CARVALHO, R. et al. IgA, IgE, and IgG subclasses to *Candida albicans* in serum and vaginal fluid from patients with vulvovaginal candidiasis. Rev Assoc Med Bras 49: 434 – 438, 2003.

DENNERSTEIN, G. Pathogenesis and treatment of genital candidiasis. Aust Fam Psysician 27: 363-69, 1998.

DEVEAU, A. et al. Farnesol induces hydrogen peroxide resistance in *Candida albicans* yeast by inhibiting the Ras-cyclic AMP signaling pathway. Eukaryot. Cell 9: 569–577, 2010.

DE VIRAGH, P. A. et al. Cloning and sequencing of two *Candida parapsilosis* genes encoding acid proteases. J. Gen. Microbiol. 139: 335–342, 1993.

DONGARI-BAGTZOGLU, A. et al. Characterization of mucosal *Candida albicans* biofilms. PLoS ONE 4, 2009.

DONLAN, R. M. Biofilms and device-associated infections. Emerg Infect Dis 7: 277-281, 2001.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. Clinical Microbiology Reviews 15: 167-193, 2002.

DOUGLAS, L. J. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. Rev Iberoam Micol 19: 139-143, 2002.

DOUGLAS, L. J. *Candida* biofilms and their role in infection. Trends in Microbiology 11(1): 30-36, 2003.

ELLEPOLA, A. N.; SAMARANAYAKE, L. P. The postantifungal effect (PAFE) of antimycotics on oral *C. albicans* isolates and its impact on candidal adhesion. Oral Dis. 4(4): 260-7, 1998.

EL-MAGHARABI, E. A.; DIXON, D. M.; BURNETT, J. W. Characterization of *Candida albicans* epidermolytic proteases and their role in yeast-cell adherence to keratinocytes. Clin Exp Dermatol 15: 183–191, 1990.

EMMANUEL N. N. et al. Genotyping and fluconazole susceptibility of *Candida albicans* strains from patients with vulvovaginal candidiasis in Jos, Nigeria. Asian Pacific Journal of Tropical Disease 48-50, 2012.

FABRY, W. et al. Isolation and purification of chlamydospores of *Candida albicans*. Med. Mycol. 41: 53–58, 2003.

FAN, S. R. et al. P. Genotype distribution of *Candida albicans* strains associated with different conditions of vulvovaginal candidiasis, as revealed by microsatellite typing. Sex Transm Infect 84: 103–106, 2008.

FENG, Q. et al. Ras signaling is required for serum-induced hyphal differentiation in *Candida albicans*. J. Bacteriol. 181: 6339–6346, 1999.

FERRAZZA, 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. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia 27(2): 58-63, 2005.

FERREIRA-PAIM, K. et al. Antifungal susceptibility, enzymatic activity, PCR-fingerprinting and ITS sequencing of environmental *Cryptococcus laurentii* isolates from Uberaba, Minas Gerais, Brazil. Mycopathologia 174(1): 41-52, 2012.

FERRER, J. Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. Int. J. Gynecol. Obstet. 71: 21-7, 2000.

FIDEL JR., P. L.; LYNCH, M. E.; SOBEL, J. D. Circulating CD4 and CD8 T cells have little impact on host defense against experimental vaginal candidiasis. Infect. Immun. 63: 2403–2408, 1995.

FIDEL JR., P. L.; SOBEL, J. D. Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. Rev Clin Microbiol 9: 335-48, 1996.

FIDEL JR., P.L.; SOBEL, J.D. Protective immunity in experimental *Candida* vaginitis. Rev Immunol. 149: 361-73, 1998.

FIDEL JR., P. L. Distinct protective host defenses against oral and vaginal candidiasis. Med Mycol. 40(4): 359-75, 2002.

FIDEL JR., P.L.; GOW, N.A.R. Host defense against vaginal candidiasis. In: CALDERONE, R. A. *Candida* and Candidiasis. Washington D.C.: ASM Press, 2002. p. 193-209.

FIDEL JR., P. L. History and new insights into host defense against vaginal candidiasis. Trends Microbiol 12: 220-227, 2004.

FIDEL JR., P. L et al. An Intravaginal Live *Candida* Challenge in Humans Leads to New Hypotheses for the Immunopathogenesis of Vulvovaginal Candidiasis. Infection and Immunity 72(5): 2939 – 2946, 2004.

FIDEL JR., P. L. Immunity in vaginal candidiasis. Curr Opin Infect Dis, 18: 107 – 111, 2005.

FIDEL JR., P. L. History and Update on Host Defense Against Vaginal Candidiasis. American Journal of Reproductive Immunology 57: 2–12, 2007.

FIELD, D. et al. Use of polymorphic short and clustered coding-region microsatellites to distinguish strains of *Candida albicans*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 15: 73–79, 1996.

FUNDYGA, R. E.; LOTT, T. J.; ARNOLD, J. Population structure of *Candida albicans*, a member of the human flora, as determined by microsatellite loci. Infect. Genet. Evol. 2: 57–68, 2002.

GANTNER, B. N.; SIMMONS, R. M.; UNDERHILL, D. M. Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. EMBO J. 24: 1277–1286, 2005.

GARCIA-SANCHEZ, S. et al. *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. Eukaryotic Cell 3: 536-545, 2004.

GE, S. et al. Prevalence of specific and phylogenetically closely related genotypes in the population of *Candida albicans* associated with genital candidiasis in China. Fungal Genetics and Biology 49: 86–93, 2012.

GILFILLAN, G. D. et al. *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. Microbiology 144: 829–838, 1998.

GIRALDO, P. et al. Vaginal colonization by *Candida* in asymptomatic women with and without a history of recurrent vulvovaginal candidiasis. Obstet Gynecol. 95(3): 413-6, 2000.

GOSWAMI D, G. R. et al. Pattern of *Candida* species isolated from patients with diabetes mellitus and vulvovaginal candidiasis and their response to single dose oral fluconazole therapy. Antimicrob Agents Chemother 49 (6): 2336-42, 2005.

GOW, N. A.; BROWN, A. J.; ODDS, F. C. Fungal morphogenesis and host invasion. Curr. Opin. Microbiol. 5: 366–371, 2002.

GOW, N. A. R. et al. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. Nature reviews microbiology 10: 112-122, 2012.

GREEN, C. B. et al. RT-PCR detection of *Candida albicans* ALS gene expression in the reconstituted human epithelium (RHE) model of oral candidiasis and in model biofilms. Microbiology 150: 267-275, 2004.

GUIDONI, E.M.B.; TOPOROVSKI, J. Infecção urinária na adolescência. Jornal de pediatria 77, 2001.

HALL, R. A. et al. CO<sub>2</sub> acts as a signalling molecule in populations of the fungal pathogen *Candida albicans*. PLoS Pathog. 6, 2010.

HARRIOTT, M. M. et al. *Candida albicans* forms biofilms on the vaginal mucosa. Microbiology 156: 3635–3644, 2010.

HASAN, F. et al. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. Microbes Infect. 11(8-9): 753–761, 2009.

HSU, C. C. et al. The inhibitory activity of linalool against the filamentous growth and biofilm formation in *Candida albicans*. Med Mycol. 4, 2012.

HAWSER, S. P.; BAILLIE, G. S.; DOUGLAS, L. J. Production of extracellular matrix by *Candida albicans* biofilms. J Med Microbiol 47: 253-256, 1998.

HENNEQUIN, C. et al. Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains. J. Clin. Microbiol. 39: 551– 559, 2001.

HILTON, C. et al. Heat shock induces chromosome loss in the yeast *Candida albicans*. Mol. Gen. Genet. 200: 162–168, 1985.

HOFLING, J. F. et al. Evaluation of Antifungal Activity of Medicinal Plant Extracts Against Oral *Candida albicans* and Proteinases. Mycopathologia 172: 117–124, 2011.

HOLANDA, A. A. R. et al. Candidíase vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia 29(1): 3-9, 2007.

HORNBY, J. M. et al. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. Appl Environ Microbiol 67: 2982-2992, 2001.

HOYER, L.L. et al. *Candida albicans* ALS1: domains related to a *Saccharomyces cerevisiae* sexual agglutinin separated by a repeating motif. Mol Microbiol 15: 39-54, 1995.

HOYER, L. L. et al. *Candida albicans* ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family. Curr. Genet. 33: 451–459, 1998.

HOYER, L.L.; PAYNE, T.L.; HECHT, J.E. Identification of *Candida albicans* ALS2 and ALS4 and localization of Als proteins to the fungal cell surface. J Bacteriol 180: 5334-5343, 1998.

HOYER, L.L.; HECHT, J.E. The ALS6 and ALS7 genes of *Candida albicans*. Yeast 16: 847-855, 2000.

HOYER, L.L. The ALS gene family of *Candida albicans*. Trends Microbiol 9: 176-180, 2001.

HOYER, L. L. et al. Discovering the Secrets of the *Candida albicans* Agglutinin-Like Sequence (ALS) Gene Family—a Sticky Pursuit. Med Mycol. 46(1): 1–15, 2008.

HUBE, B. et al. Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. Mol Microbiol 14: 87–99, 1994.

HUBE, B. et al. Extracellular proteolytic activity of *Candida* species. In: VANDEN BOSSCHE, H.; STEVENS, D.A.; ODDS, F.C. Proceedings of the Fifth Symposium on Topic in Mycology: Host–Fungus Interplay. Bethesda: National Foundation for Infectious Diseases, 1997. p. 109–122.

HUBE, B.; NAGLIK, J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. Microbiology 147: 1997-2005, 2001.

HUDSON, D. A. et al. Identification of the dialyzable serum inducer of germ-tube formation in *Candida albicans*. Microbiology 150: 3041–3049, 2004.

ILKIT, M. et al. Evaluation of Albicans ID2 and Biggy agar for the isolation and direct identification of vaginal yeast isolates. Journal of Medical Microbiology 56: 762–765, 2007.

IMBERT, C. et al. Influence of sub-inhibitory concentrations of conventional antifungals on metabolism of *Candida albicans* and on its adherence to polystyrene and extracellular matrix proteins. Medical Mycology 40: 123–129, 2002.

IWATA T. et al. Genotyping of *Candida albicans* on the basis of polymorphisms of ALT repeats in the repetitive sequence (RPS). Journal of Dermatological Science 41: 43–54, 2006.

JACOBSEN, M. D. et al. Mixed *Candida albicans* strain populations in colonized and infected mucosal tissues. FEMS Yeast Res 8: 1334–1338, 2008.

JANBON, G.; SHERMAN, F.; RUSTCHENKO, E. Appearance and properties of L-sorbose-utilizing mutants of *Candida albicans* obtained on a selective plate. Genetics 153: 653–664, 1999.

JIN, Y. et al. Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of human immunodeficiency virus infection. J Clin Microbiol 41: 2961-7, 2003.

KALKANCI, A. et al. Yeast vaginitis during pregnancy: susceptibility testing of 13 antifungal drugs and boric acid and the detection of four virulence factors. Medical Mycology Early Online: 1–9, 2012.

KARAHAN, Z. C. et al. 25S intron analysis followed by restriction enzyme digestion performed for genotyping *Candida albicans* isolates. Mikrobiyol Bul. 46(2): 257-65, 2012.

KARKOWSKA-KULETA, J.; RAPALA-KOSIK, M.; KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans: molecular basis of virulence in *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus fumigatus*. Acta Biochim Pol. 56: 211–24, 2009.

KENT, H. L. Epidemiology of vaginitis. Am J Obstet Gynecol 165: 1168 – 1175, 1991.

KING, R. D.; LEE, J. C.; MORRIS, A. L. Adherence of *Candida albicans* and other *Candida* species to mucosal epithelium. Infect. Immun. 27: 667-674, 1980.

KLOTZ, S. A. Adherence of *Candida albicans* to components of the subendothelial extracellular matrix. FEMS Microbiol. Lett. 68: 249-254, 1990.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. The Yeasts, a taxonomic study. 4ª edição. Amsterdam: Elsevier Science B. V., 1998.

KWON-CHUNG, K. J. et al. Genetic evidence for role of extracellular proteinase in virulence of *candida albicans*. Infection and Immunity 49: 571-575, 1985.

LACAZ, C.S. et al. Tratado de Micologia Médica. 9ª ed. São Paulo: Savier, 2002. 1104 p.

LATTIF, A. A. Molecular typing and in vitro fluconazole susceptibility of *Candida* species isolated from diabetic and nondiabetic women with vulvovaginal candidiasis in India. Journal of Microbiology, Immunology and Infection 44, 2011.

LEHRER, N. et al. Pathogenesis of vaginal candidiasis: studies with a mutant which has reduced ability to adhere in vitro. J Med Vet Mycol. 24(2): 127-31, 1986.

LEIGH, J. E. et al. *Candida*-specific systemic cell-mediated immune reactivities in HIV-infected persons with and without mucosal candidiasis. J Infect Dis, 183: 277-285, 2001.

LENG, P.; SUDBERY, P. E.; BROWN, A. J. Rad6p represses yeast-hypha morphogenesis in the human fungal pathogen *Candida albicans*. Mol. Microbiol. 35: 1264–1275, 2000.

LEWIS, R. E. et al. Lack of catheter infection by the *efg1/efg1 cph1/cph1* double-null mutant, a *Candida albicans* strain that is defective in filamentous growth. Antimicrob Agents Chemother 46: 1153-1155, 2002.

LINHARES, I.M. et al. Candidíase vulvovaginal recorrente: Fisiopatogênese, diagnóstico e tratamento. Ver. Ciênc. Méd 14(4): 373-378, 2005.

LI, J.; BAI, F. Y. Single-strand conformation polymorphism of microsatellite for rapid strain typing of *Candida albicans*. Med Mycol 45: 629–35, 2007.

LI, J. et al. Biased Genotype Distributions of *Candida albicans* Strains Associated with Vulvovaginal Candidosis and Candidal Balanoposthitis in China. Clinical Infectious Diseases 47: 1119–25, 2008.

LIAN, C. et al. Genotype of *Candida* species associated with different conditions of vulvovaginal candidosis. Mycoses 47: 495–502, 2004.

LIN, X. L.; LI, Z.; ZUO, X. L. Study on the relationship between vaginal and intestinal candida in patients with vulvovaginal candidiasis. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi. 46(7): 496-500, 2011.

LIU, Y.; FILLER, S. G. *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin. Eukaryot. Cell 10: 168–173, 2011.

LO, H. J. et al. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. Cell 90: 939–949, 1997.

LOCKHART S. R. et al. Most Frequent Scenario for Recurrent *Candida* Vaginitis Is Strain Maintenance with “Substrain Shuffling”: Demonstration by Sequential DNA Fingerprinting with Probes Ca3, C1, and CARE2. Journal of Clinical Microbiology 767–777, 1996.

LORENZ, M. C.; BENDER, J. A.; FINK, G. R. Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. Eukaryot. Cell 3: 1076–1087, 2004.

LOTT, T. J. et al. Stability of allelic frequencies and distributions of *Candida albicans* microsatellite loci from U.S. population-based surveillance isolates. J. Clin. Microbiol. 41: 1316–1321, 2003.

LOTZ, H. et al. RBR1, a novel pH-regulated cell wall gene of *Candida albicans*, is repressed by RIM101 and activated by NRG1. Eukaryot. Cell 3: 776–784, 2004.

LUO, G. et al. *Candida albicans* Hyr1p confers resistance to neutrophil killing and is a potential vaccine target. J. Infect. Dis. 201: 1718–1728, 2010.

MAGEE, B. B.; SOUZA, T. M.; MAGEE, P. T. Strain and species identification by restriction length polymorphism in the ribosomal DNA repeats of *Candida* species. J. Bacteriol. 169: 1639–1643, 1987.

MAIDAN, M. M. et al. The G protein-coupled receptor Gpr1 and the G $\alpha$  protein Gpa2 act through the cAMP protein kinase A pathway to induce morphogenesis in *Candida albicans*. Mol. Biol. Cell 16: 1971–1986, 2005.

MARDH, P. A. et al. Facts and myths on recurrent vulvovaginal candidosis: a review on epidemiology, clinical manifestations, diagnosis, pathogenesis and therapy. Int J STD AIDS 13:522-39, 2002.

MARDH, P. A.; NOVIKOVA, N.; STUKALOVA, E. Colonisation of extragenital sites by *Candida* in women with recurrent vulvovaginal candidosis. Br J Obstet Gynaecol 110: 934–7, 2003.

MARRIE, T. J.; COSTERTON, J. W. A scanning and transmission electron microscopic study of the surfaces of intrauterine contraceptive devices. Am J Obstet Gynecol. 15: 384-94, 1983.

MASHBURN, J. Etiology, diagnosis, and management of vaginitis. J Midwifery Womens Health. 51(6): 423-30, 2006.

MAVOR, A. L.; THEWES, S.; HUBE, B. Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes. Curr Drug Targets 6: 863-74, 2005.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. Virulence 4(2): 119-128, 2013.

MCCULLOUGH, M. J. et al. Epidemiology of *Candida albicans* isolates from heroin addicts analysed by DNA typing. Med Mycol. 36: 213–217, 1998.

MCCULLOUGH, M. J.; CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A. Molecular epidemiology of the global and temporal diversity of *C. albicans*. In: Abstracts of the 98th General Meeting of the American Society for Microbiology. Washington, D.C: American Society of Microbiology, 1998. p. 260.

MCCULLOUGH, M. J.; CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A. Molecular and phenotypic characterization of genotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea*. J Clin Microbiol 37: 417-21, 1999a.

MCCULLOUGH, M. J.; CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A. Molecular epidemiology of the global and temporal diversity of *Candida albicans*. Clin.Infect.Dis. 29(5): 1220-1225, 1999b.

MENDLING, W.; SEEBACHER, C. Guideline vulvovaginal candidosis: guideline of the German Dermatological Society, the German Speaking Mycological Society and the Working Group for Infections and Infectimmunology of the German Society for Gynecology and Obstetrics. Mycoses. 46(9-10): 365-9, 2003.

MERCURE, S.; MONTPLAISIR, S.; LEMAY, G. Correlation between the presence of a self-splicing intron in the 25S rDNA of *C. albicans* and strain susceptibility to 5-fluorocytosine. Nucleic Acids Res. 21: 6020–6027, 1993.

MERSON-DAVIES, L. A.; ODDS, F. C. A morphology index for characterization of cell shape in *Candida albicans*. J. Gen. Microbiol. 135: 3143-3152, 1989.

METZGAR, D. et al. Random amplification of polymorphic DNA and microsatellite genotyping of pre- and posttreatment isolates of *Candida* spp. from human immunodeficiency virus-infected patients on different fluconazole regimens. J. Clin. Microbiol. 36: 2308–2313, 1998.

MEYER, W. et al. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA—a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. Electrophoresis 20: 1790–1799, 1999.

MILES, M. R.; OLSEN, L.; ROGERS, A. Recurrent vaginal candidiasis. Importance of an intestinal reservoir. JAMA 238: 1836–87, 1977.

MILLAR, B. C. et al. Genotypic subgrouping of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by 25S intron analysis. Letters in Applied Microbiology 35: 102–106, 2002.

MONOD, M.; BORG-VON, Z. M. Secreted aspartic proteases as virulence factors of *Candida* species. Biol Chem 383: 1087-1093, 2002.

MONOD, M. et al. Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. Mol. Microbiol. 13: 357–368, 1994.

MONROY-PEREZ, E. et al. Frequency and expression of ALS and HWP1 genotypes in *Candida albicans* strains isolated from Mexican patients suffering from vaginal candidosis. Mycoses 55: 151–157, 2012.

MORAES, P. S. A. Candidíase vaginal de repetição Aspectos alérgicos e imunológicos. Femina 24: 735-37, 1996.

MORAN, G. P.; SULLIVAN, D. J.; COLEMAN, D. C. Emergence of Non-*Candida albicans* *Candida* Species as Pathogens. In: CALDERONE, R. *Candida and Candidiasis*. Washington D. C.: ASM Press, 2002. p 37 – 53.

MORAN, G. P.; COLEMAN, D. C.; SULLIVAN, D. J. Comparative Genomics and the Evolution of Pathogenicity in Human Pathogenic Fungi. *Eukaryotic Cell* 10 (1): 34–42, 2011.

MOREIRA, D.; PAULA, C. R. Vulvovaginal candidiasis. *Int J Gynaecol Obstet*. 92(3): 266-7, 2006.

MORES, A. U. et al. Enhancement of Secretory Aspartyl Protease production in biofilms of *Candida albicans* exposed to sub-inhibitory concentrations of fluconazole. *Mycoses* 54: 195–201, 2009.

MUKHERJEE, P. K. et al. *Candida* biofilm: a well-designed protected environment. *Medical Mycology* 43: 191-208, 2005.

MURPHY, J. M.; WALTON, J. D. Three extracellular proteases from *Cochliobolus carbonum*: cloning and targeted disruption of ALP1. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 9: 290–297, 1996.

NAGLIK, J. R.; CHALLACOMBE, S. J.; HUBE, B. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(3): 400–428, 2003.

NAGLIK, J. R. et al. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cellular Microbiology* 10: 915–926, 2004.

NAGLIK J. R. et al. *Candida albicans* HWP1 gene expression and host antibody responses in colonization and disease. *Journal of Medical Microbiology* 55: 1323–1327, 2006.

NAILIS, H. et al. Monitoring *ALS1* and *ALS3* gene expression during *in vitro* *Candida albicans* biofilm formation under continuous flow conditions. *Mycopathologia* 167(1), 9–17, 2009.

NANTEL, A. et al. Transcription profiling of *Candida albicans* cells undergoing the yeast-to-hyphal transition. *Mol Biol Cell* 13: 3452–3465, 2002.

NAS, T. et al. Expression of *ALS1*, *HWP1* and *SAP4* genes in *Candida albicans* strains isolated from women with vaginitis. *Folia Microbiol (Praha)*. 53(2): 179-83, 2008.

NIKAWA, H. et al. Effects of salivary or serum pellicles on the *Candida albicans* growth and biofilm formation on soft lining materials *in vitro*. *J Oral Rehabil* 24: 594-604, 1997.

NIKAWA H. et al. Relationship between thigmotropism and *Candida* biofilm formation *in vitro*. *Mycopathologia* 144: 125-129, 1998.

NOBILE, C. J.; MITCHELL, A. P. Regulation of cell-surface genes and biofilm formation by the *C. albicans* transcription factor Bcr1p. Curr. Biol. 15(12), 1150–1155, 2005.

NOBILE, C. J. et al. Critical role of Bcr1-dependent adhesins in *C. albicans* biofilm formation in vitro and in vivo. PLoS Pathog 2, 2006a.

NOBILE, C. J. et al. Function of *Candida albicans* adhesin Hwp1 in biofilm formation. Eukaryot Cell 5, 1604–1610, 2006b.

NOBILE, C. J. et al. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. Cell 148(1–2), 126–138, 2012.

NOUMI, E.; SNOUSSI, M.; BAKHROUF, A. *In vitro* effect of *Melaleuca alternifolia* and *Eucalyptus globulus* essential oils on mycelia formation by oral *Candida albicans* strains. African Journal of Microbiology Research 4(12): 1332–1336, 2010.

NYIRJESY P. Chronic vulvovaginal candidiasis. Am Fam Physician 63: 697–702, 2001.

ODDS, F.C. et al. *Candida* concentrations in the vagina and their association with signs and symptoms of vaginal candidosis. J Med Vet Mycol 26: 277–83, 1988.

ODDS, F. C. *Candida* species and virulence. ASM News 60: 313 – 318, 1994a.

ODDS, F. C. Pathogenesis of *Candida* infections. J Am Acad Dermatol 31: 52–5, 1994b.

ODDS, F. C.; VAN NUFFEL, L.; DAMS, G. Prevalence of *Candida dubliniensis* Isolates in a Yeast Stock Collection. Journal of Clinical Microbiology, 36(10): 2869–2873, 1998.

ODDS, F. C.; VAN NUFFEL, L.; GOW, N. A. Survival in experimental *Candida albicans* infections depends on inoculum growth conditions as well as animal host. Microbiology 146: 1881–1889, 2000.

ODDS, F. C.; GOW, N. A.; BROWN, A. J. Fungal virulence studies come of age. Genome Biol 2, 2001.

ODDS, F. C. et al. R. *Candida albicans* Strain Maintenance, Replacement, and Microvariation Demonstrated by Multilocus Sequence Typing. Journal of Clinical Microbiology 44(10): 3647–3658, 2006.

ODDS, F. C. et al. Molecular Phylogenetics of *Candida albicans*. Eukaryotic Cell 6(6): 1041–1052, 2007.

ODDS, F. C. Secreted proteinases and *Candida albicans* virulence. Microbiology 154: 3245–3246, 2008.

OLLERT, M. W. et al. Mechanisms of adherence of *Candida albicans* to cultured human epidermal keratinocytes. Infect Immun 61: 4560–4568, 1993.

OMAR, A. A. Gram stain versus culture in the diagnosis of vulvovaginal candidiasis. East Mediterr Health J. 7(6): 925-34, 2001.

O'TOOLE G. A.; KOLTER, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. Molecular Microbiology 28(3): 449-461, 1998.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. Annu. Rev. Microbiol. 54: 49–79, 2000.

PAIVA, L. C. F. et al. Assessment of in vitro biofilm formation by *Candida* species isolates from vulvovaginal candidiasis and ultrastructural characteristics. Micron 43: 497–502, 2012.

PEREPNIKHATKA, V. et al. Specific chromosome alterations in fluconazole-resistant mutants of *Candida albicans*. J. Bacteriol. 181: 4041–4049, 1999.

PICHOVA, I. et al. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. Inhibition with peptidomimetic inhibitors. Eur. J. Biochem. 268: 2669–2677, 2001.

PIRONE, E. et al. Can proctological procedures resolve perianal pruritus and mycosis? A prospective study of 23 cases. Int J Colorectal Dis. 7(1): 18-20, 1992.

PUJOL, C. et al. Parity of MLEE, RAPD and Ca3 hybridization as fingerprinting methods for *Candida albicans*. J. Clin. Microbiol. 35: 2348–2358, 1997.

RAMAGE, G. et al. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. Rev Iberoam Micol 18: 163-170, 2001.

RAMAGE, G. et al. The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in *Candida albicans*. FEMS Microbiol Lett 214, 95–100, 2002.

RAY, T. L.; PAYNE, C. D. Scanning electron microscopy of epidermal adherence and cavitation in murine candidiasis: a role for *Candida* acid proteinase. Infect. Immun. 56: 1942–1949, 1988.

RAY, T.L.; WUEPPER, K.D. Experimental cutaneous candidiasis in rodents, II, Role of the stratum corneum barrier and serum complement as a mediator of a protective inflammatory response. Archives in Dermatology 114: 538-543, 1979.

ROMANI, L.; BISTONI, F; PUC CETTI, P. Adaptation of *Candida albicans* to the host environment: the role of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts. Curr. Opin. Microbiol. 6: 338–343, 2003.

ROSA, M.I.; RUMEL, D. Fatores associados à candidíase vulvovaginal: Estudo exploratório. Rev. Bras. Ginecol. Obstet. 26: 65-70, 2004.

ROSS I. K. et al. The secreted aspartate proteinase of *Candida albicans*: physiology of secretion and virulence of a proteinase deficient mutant. Journal of General Microbiology 136: 687-694, 1990.

RUHNKE, M. et al. Genotypic relatedness of yeast isolates from women infected with human immunodeficiency virus and their children. Mycoses 42: 385–394, 1999.

RUHNKE, M. Skin ad Mucous Membrane Infections. In: CALDERONE, R. Candida and Candidiasis. Washington D. C.: ASM Press, 2002. p 307 – 325.

RUSTCHENKO, E. P.; HOWARD, D. H.; SHERMAN, F. Chromosomal alterations of *Candida albicans* are associated with the gain and loss of assimilating functions. J. Bacteriol. 176: 3231–3241, 1994.

SALYERS, A.; WITT, D. Virulence factors that promote colonization. In: SALYERS, A.; WITT, D. Bacterial pathogenesis: a molecular approach. Washington, DC: ASM Press, 1994. p. 30–46.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: A Laboratory manual. Cold Spring Harbor Press, New York, 1989.

SAMPAIO, P. et al. Highly polymorphic microsatellite for identification of *Candida albicans* strains. J. Clin. Microbiol. 41:552–557, 2003.

SAMPAIO, P. et al. New Microsatellite Multiplex PCR for *Candida albicans* Strain Typing Reveals Microevolutionary Changes. Journal of Clinical Microbiology, 43(8): 3869 – 3876, 2005.

SARDI, J. C. et al. Genetic and phenotypic evaluation of *Candida albicans* strains isolated from subgingival biofilm of diabetic patients with chronic periodontitis. Med Mycol., 2011.

SAVILLE, S. P. et al. Engineered control of cell morphology *in vivo* reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. Eukaryot. Cell 2: 1053–1060, 2003.

SCHALLER, M. et al. Effect of antimycotic agents on the activity of aspartyl proteinases secreted by *Candida albicans*. Journal of Medical Microbiology, 52: 247–249, 2003.

SCHALLER M. *Candida albicans* - interactions with the mucosa and the immune system. J Dtsch Dermatol Ges. 4(4): 328-36, 2006.

SCHERER, S.; STEVENS, D. A. Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. J Clin Microbiol. 25: 675–679, 1987.

SCHERWITZ, C. Ultrastructure of human cutaneous candidosis. J. Invest. Dermatol. 78: 200–205, 1982.

SCHMID, J. et al. Evidence for a general purpose genotype in *Candida albicans*, highly prevalent in multiple geographic regions, patient types and types of infection. Microbiology 145: 2405–2413, 1999.

SCHROPPEL, K. et al. Evolution and Replacement of *Candida albicans* Strains during Recurrent Vaginitis Demonstrated by DNA Fingerprinting. Journal of Clinical Microbiology 2646-2654, 1994.

SCHUMAN, P. et al. Mucosal *Candida* colonization and candidiasis in women with or at risk for human immunodeficiency virus infection. Clin Infect Dis 27: 1161 – 1167, 1998.

SEGAL, E.; SOROKA, A.; SCHECHTER, A. Correlative relationship between adherence of *Candida albicans* to human vaginal epithelial cells in vitro and candidal vaginitis. Sabouraudia 22(3): 191-200, 1984.

SHAPIRO, R. S. et al. Hsp90 orchestrates temperature dependent *Candida albicans* morphogenesis via Ras1-PKA signaling. Curr. Biol. 19: 621–629, 2009.

SHARKEY, L. L. et al. *HWP1* functions in the morphological development of *Candida albicans* downstream of *EFG1*, *TUP1*, and *RBF1*. J Bacteriol 181: 5273–5279, 1999.

SHEMER, R. et al. A highly polymorphic degenerate microsatellite for molecular strain typing of *Candida krusei*. Microbiology 147: 2021–2028, 2001.

SHI, W. et al. Analysis of genital *Candida albicans* infection by rapid microsatellite markers genotyping. Chinese Medical Journal 120(11): 975-980, 2007.

SHI, Q. M. et al. Critical role of DNA checkpoints in mediating genotoxic-stress-induced filamentous growth in *Candida albicans*. Mol. Biol. Cell 18: 815–826, 2007.

SHREAZ, S. et al. Cinnamic aldehydes affect hydrolytic enzyme secretion and morphogenesis in oral *Candida* isolates. Microbial Pathogenesis 52: 251-258, 2012.

SIDRIM, J. F. C., ROCHA, M. F. G. Micologia Médica: à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004. 388 p.

SMITH, ONIONS. The preservation and maintenance of living fungi. 1<sup>a</sup> ed. USA: Commonwealth Mycological Institute, 1983. 51 p.

SMITHSON, S. L. et al. Cloning and characterization of a gene encoding a cuticle-degrading protease from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Gene 166: 161–165, 1995.

SOBEL, J. D.; MULLER, G.; BUCKLEY, H. R. Critical Role of Germ Tube Formation in the Pathogenesis of Candidal Vaginitis. Infection and immunity 44(3): 576-580, 1984.

SOBEL, J. D. Epidemiology and pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. Am J Obstet Gynecol 152: 924–35, 1985.

SOBEL, J. D. Pathogenesis and epidemiology of vulvovaginal candidiasis. Ann. N.Y. Acad. Sci. 544: 547–557, 1988.

SOBEL, J. D. Vaginal infections in adult women. Med Clin North Am. 74(6): 1573-602, 1990.

SOBEL, JD. Pathogenesis and treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis. J Infect Dis 147: 359, 1992.

SOBEL, J. D. Candidal vulvovaginitis. Clin Obstet Gynecol 36: 153-165, 1993.

SOBEL, J. D. Vaginitis. N. Engl. J. Med. 337: 1896-1903, 1997.

SOBEL, J. D. et al. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. Am J Obstet Gynecol 178: 203-11, 1998.

SOBEL, J. D. Vulvovaginitis in healthy women. Comp Ther 27: 335-46, 1999.

SOLL, D. R. The Ins and Outs of DNA Fingerprinting the Infectious Fungi. Clinical Microbiology Reviews 13(2): 332-370, 2000.

STAAB, J. F.; FERRER, C. A.; SUNDSTROM, P. Developmental expression of a tandemly repeated, proline-and glutamine-rich amino acid motif on hyphal surfaces on *Candida albicans*. J. Biol. Chem. 271: 6298–6305, 1996.

STAAB, J. F. et al. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. Science 283: 1535–1538, 1999.

STEVENS, D. A.; ODDS, F. C.; SCHERER, S. Application of DNA typing methods to *Candida albicans* epidemiology and correlation with phenotype. Rev Infect Dis. 12: 258–266, 1990.

STICHTERNOOTH, C.; ERNST, J. F. Hypoxic adaptation by Efg1 regulates biofilm formation by *Candida albicans*. Appl. Environ. Microbiol. 75: 3663–3672, 2009.

STICHTERNOOTH, C. et al. Sch9 kinase integrates hypoxia and CO<sub>2</sub> sensing to suppress hyphal morphogenesis in *Candida albicans*. Eukaryot. Cell 10: 502–511, 2011.

STOODLEY, P. et al. Molecular and imaging techniques for bacterial biofilms in arthroplastic joint infections. Clin Orthop Relat Res 437: 31–40, 2005.

SUDBERY, P.; GOW, N.; BERMAN, J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 12: 317–24, 2004.

SUGITA, T. et al. Extracellular proteinase and phospholipase activity of three genotypic strains of a human pathogenic yeast, *Candida albicans*. Microbiol Immunol. 46(12): 881-3, 2002.

SULLIVAN, D.; COLEMAN, D. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. J Clin Microbiol. 36: 329–334, 1998.

SULLIVAN, D. J. et al. *Candida dubliniensis* sp nov: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. Microbiology 141: 1507-21, 1995.

SWEET, S. P. Selection and pathogenicity of *Candida albicans* in HIV Infection. Oral Dis 3: S88 – S95, 1997.

SWOBODA, R. K. et al. Structure and regulation of the HSP90 gene from the pathogenic fungus *Candida albicans*. Infect. Immun. 63: 4506–4514, 1995.

TAMURA, M. et al. Molecular Characterization of New Clinical Isolates of *Candida albicans* and *C. dubliniensis* in Japan: Analysis Reveals a New Genotype of *C. albicans* with Group I Intron. Journal of Clinical Microbiology, 4309–4315, 2001.

TAVANTI, A. et al. Optimization and validation of multilocus sequence typing for *Candida albicans*. J. Clin. Microbiol. 41:3765–3776, 2003.

TEN CATE, J. et al. Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. J Dent Res. 88:105–15, 2009.

THANOS, M. et al. Rapid identification of *Candida* species by DNA fingerprinting with PCR. J. Clin. Microbiol. 34: 615–621, 1996.

THEIN, Z. M. et al. Community lifestyle of *Candida* in mixed biofilms: a mini review. Mycoses 52(6), 467–475, 2009.

TOGNI, G. et al. Isolation and nucleotide sequence of the extracellular acid protease gene (ACP) from the yeast *Candida tropicalis*. FEBS Lett. 286:181–185, 1991.

TRUMBORE, D. J.; SOBEL, J. D. Recurrent vulvovaginal candidiasis: vaginal epithelial cell susceptibility to *Candida albicans* adherence. Obstet Gynecol. 67(6): 810-2, 1986.

TSANG, P. W. et al. Loss of heterozygosity, by mitotic gene conversion and crossing over, causes strain-specific adenine mutants in constitutive diploid *Candida albicans*. Microbiology 145:1623–1629, 1999.

TUMBARELLO, M. et al. Biofilm Production by *Candida* Species and Inadequate Antifungal Therapy as Predictors of Mortality for Patients with Candidemia. Journal of Clinical Microbiology 45(6): 1843 – 1850, 2007.

US, E.; CENGIZ, S.A. Prevalence and phenotypic evaluation of *Candida dubliniensis* in pregnant women with vulvovaginal candidosis in a university hospital in Ankara. Mycoses 50: 13–20, 2006.

VAL, I.C.C.; ALMEIDA FILHO, G.L. Abordagem atual da candidíase vulvovaginal. J Bras Doenças Sex Transm 13: 3-5, 2001.

VASCONCELLOS, M.; AZEVEDO, C. S. L.; ROCCO, R. Vulvovaginites por fungos durante a gravidez. Femina 24: 495-98, 1996.

WACHTLER, B. et al. From attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. PLoS ONE 6, 2011.

WALKER, L. A. et al. Genome-wide analysis of *Candida albicans* gene expression patterns during infection of the mammalian kidney. Fungal Genet. Biol. 46: 210–219, 2009.

WARREN NG; HAZEN KC. *Candida*, *Cryptococcus* and other yeast of medical importance. Manual of Clinical Microbiology. 723-727, 1995.

WATANABE, N. A. et al. E1210, a new broad-spectrum antifungal, suppresses *Candida albicans* hyphal growth through inhibition of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis. Antimicrob Agents Chemother. 56(2): 960-71, 2012.

WEISSENBACHER, S. et al. Value of *Candida* polymerase chain reaction and vaginal cytokine analysis for the differential diagnosis of women with recurrent vulvovaginitis. Infect Dis Obstet Gynecol 8: 244-7, 2000.

WHITE, T. C.; AGABIAN, N. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases: isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors. J. Bacteriol. 177: 5215–5221, 1995.

WHITE, S.; LARSEN, B. *Candida albicans* morphogenesis is influenced by estrogen. Cellular and Molecular Life Sciences 53: 744–749, 1997.

WHITEWAY, M.; BACHEWICH, C. Morphogenesis in *Candida albicans*. Annual Review of Microbiology 61: 529–553, 2007.

WORMLEY, F. L.; CUTRIGHT J. L.; FIDEL, P. L. Jr. Multiple experimental designs to evaluate the role of T-cell-mediated immunity against experimental vaginal *Candida albicans* infection. Med Mycol 41: 401 – 410, 2003.

XU, J. et al. Species and Genotypic Diversities and Similarities of Pathogenic Yeasts Colonizing Women. Journal of Clinical Microbiology 3835–3843, 1999.

XU, X. L. et al. Bacterial peptidoglycan triggers *Candida albicans* hyphal growth by directly activating the adenylyl cyclase Cyr1p. Cell Host Microbe 4: 28–39, 2008.

YU, Q. et al. In vitro activity of verapamil alone and in combination with fluconazole or tunicamycin against *Candida albicans* biofilms. International Journal of Antimicrobial Agents 41:179– 182, 2013.

ZAUGG, C. et al. Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. Infect. Immun. 69: 405–412, 2001.

ZHANG, L. et al. Bisbibenzyls, a New Type of Antifungal Agent, Inhibit Morphogenesis Switch and Biofilm Formation through Upregulation of DPP3 in *Candida albicans*. Plos one 6, 2011a.

ZHANG, Y. et al. Blocking of *Candida albicans* biofilm formation by cis-2-dodecenoic acid and trans-2-dodecenoic acid. J Med Microbiol. 60(Pt 11): 1643-50, 2011b.

ZHENG, X.; WANG, Y. Hgc1, a novel hypha-specific G1 cyclin-related protein regulates *Candida albicans* hyphal morphogenesis. EMBO J. 23: 1845–1856, 2004.

ZIARRUSTA G.B. Vulvovaginitis candidiásica. Rer. Iberoam Micol. 19: 22-4, 2002.

## APÊNDICE A



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Esclarecimentos

Este é um convite para você participar da pesquisa “Caracterizações genotípicas e fenotípicas de isolados clínicos de *Candida albicans* oriundos de pacientes sãs e com candidíase vulvovaginal” que é coordenada pelo professor Dr. Guilherme Maranhão Chaves, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas e pela aluna de mestrado em Ciências Farmacêuticas Mariana Araújo Paulo de Medeiros, com a participação das alunas Ana Patrícia Vieira de Melo (iniciação científica) e Rafaela de Melo Pereira (mestrado), do Professor Dr. Edílson Dias de Araújo, do Departamento de Tocoginecologia da UFRN e da professora Dr<sup>a</sup>. Eveline Pipolo Milan, do Departamento de Infectologia da UFRN. Sua participação é voluntária, o que significa que você poderá desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento, sem que isso lhe traga nenhum prejuízo ou penalidade.

Essa pesquisa procura avaliar os fatores de virulência de *C. albicans*, bem como o perfil genético desse patógeno, correlacionando-os e buscando entender os mecanismos que levam ao desenvolvimento da candidíase vulvovaginal, auxiliando na prevenção e tratamento dessa enfermidade. Caso decida aceitar o convite, você responderá a um questionário e será submetida ao seguinte procedimento: coleta de amostras de secreção vaginal e anal, não dolorosa, realizada com “swab” (espécie de cotonete) por profissional habilitado. Você será agendada para outras coletas mensalmente, mas caso apresente sintomas deverá retornar antes do período agendado.

O risco de dano à mucosa vaginal e/ou anal será minimizado pela correta realização da coleta, utilizando-se metodologia e materiais adequados. Espera-se que não ocorra nenhum dano ao participante em consequência desta pesquisa, mas no caso de qualquer problema você terá toda a assistência. Você não receberá nenhum pagamento por participar desta pesquisa.

Todas as informações obtidas serão sigilosas e seu nome não será identificado em nenhum momento. Os dados serão guardados em local seguro e a divulgação dos resultados será feita de forma a não identificar os voluntários.

Você ficará com uma cópia deste Termo e toda a dúvida que você tiver a respeito desta pesquisa, poderá perguntar diretamente para o professor Guilherme Maranhão Chaves, no endereço R. Gen. Gustavo de Farias, s/n, Petrópolis, Natal/RN ou pelo telefone 3342-9801. Dúvidas a respeito da ética dessa pesquisa poderão ser questionadas ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Onofre Lopes no endereço Av. Nilo Peçanha, 620 – Petrópolis, Natal/RN ou pelo telefone 3342-5003.

Consentimento Livre e Esclarecido

Declaro que compreendi os objetivos desta pesquisa, como ela será realizada, os riscos e benefícios envolvidos e concordo em participar voluntariamente da pesquisa “Caracterizações genotípicas e fenotípicas de isolados clínicos de *Candida albicans* oriundos de pacientes sãs e com candidíase vulvovaginal”. Também autorizo o armazenamento e possível uso futuro de leveduras isoladas a partir das amostras de secreção anal e/ou vaginal coletadas durante a pesquisa.

Participante da pesquisa: \_\_\_\_\_

Assinatura do participante: \_\_\_\_\_

Pesquisador responsável: \_\_\_\_\_

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

Natal \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## APÊNDICE B



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS**

**Caracterizações genotípicas e fenotípicas de isolados clínicos de *Candida albicans* oriundos de pacientes sãs e com candidíase vulvovaginal**

## QUESTIONÁRIO

<b>Paciente:</b>		<b>Reg.:</b>	<b>Data:</b>
<b>Idade:</b>	<b>Profissão:</b>	<b>Telefone/End.:</b>	
<b>Fatores de risco associados:</b>			
Vida sexual ativa: Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> - há _____ anos - _____ parceiros/ano			
Imunossupressores <input type="checkbox"/>	Diabetes <input type="checkbox"/>	Imunodepressão (AIDS, neoplasia, etc.) <input type="checkbox"/>	
Corticoterapia atual <input type="checkbox"/>	Antibióticos (últimos 30 dias) <input type="checkbox"/>	Rinite alérgica <input type="checkbox"/>	
Asma <input type="checkbox"/>	Outras alergias <input type="checkbox"/>	Traumatismo <input type="checkbox"/>	
Absorvente interno <input type="checkbox"/>	DIU <input type="checkbox"/>	Uso de calças apertadas <input type="checkbox"/>	
Roupas íntimas de nylon <input type="checkbox"/>	Anticoncepcional oral atual <input type="checkbox"/> - Especificar _____		
Reposição hormonal <input type="checkbox"/> - Especificar _____			
Gravidez <input type="checkbox"/>			
<b>Quadro clínico:</b>			
Prurido <input type="checkbox"/>	Leucorréia <input type="checkbox"/>	Dispareunia <input type="checkbox"/>	Edema <input type="checkbox"/> Eritema <input type="checkbox"/>
Disúria <input type="checkbox"/>	Ardor <input type="checkbox"/>	Odor fétido <input type="checkbox"/>	
<b>Uso de antifúngicos (últimos 10 dias) <input type="checkbox"/> - Especificar: _____</b>			
<b>Ocorrência de candidíase vulvovaginal recorrente <input type="checkbox"/></b>			
<b>Observações:</b>			

## APÊNDICE C

Artigo intitulado “Genetic relatedness among vaginal and anal strains of *Candida albicans* sequentially obtained from women with vulvovaginal candidiasis in Brazil” a ser submetido ao periódico “American Journal of Obstetrics & Gynecology” (AJOG).

**TITLE PAGE**

Genetic relatedness among vaginal and anal isolates of *Candida albicans* from women with vulvovaginal candidiasis

Mariana A. P. MEDEIROS M.Sc.<sup>1</sup>; Ana Patrícia V. MELO B.Sc.<sup>1</sup>; Sarah S. GONÇALVES Ph.D.<sup>2</sup>; Eveline P. MILAN MD, Ph.D.<sup>3</sup>; Guilherme M. CHAVES Ph.D.<sup>1</sup>

1 Natal city, Rio Grande do Norte state, Brazil; Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Rio Grande do Norte

2 Sao Paulo city, Sao Paulo state, Brazil; Department of Medicine, Federal University of São Paulo

3 Natal city, Rio Grande do Norte state, Brazil; Department of Infectology, Federal University of Rio Grande do Norte

The authors report no conflict of interest.

Financial support: FAPERN (Grant 013/2009)

Reprints will not be available.

Author responsible for correspondence

Name: Guilherme Maranhão Chaves

Address: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde.

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Laboratório de Micologia Médica e Molecular. Rua. Gal. Gustavo Cordeiro de Faria S/N. Petrópolis. Natal, RN – Brasil.

CEP: 59012-570

Phone number: 00 55 (84) 3342-9801

Email address: guilherme.chaves@ufrnet.br

Word count abstract: 242; Word count main text: 2553.

**CONDENSATION AND SHORT VERSION OF TITLE**

**Condensation:** Microevolution of vaginal isolates and replacement of anal isolates is the most frequent clinical scenario observed in patients with vulvovaginal candidiasis.

**Short version of title:** Genetic relatedness among *Candida albicans* strains in vulvovaginal candidiasis.

## ABSTRACT

**Objective:** To evaluate genetic relatedness among *C. albicans* strains sequentially obtained from the vagina and anus of women with vulvovaginal candidiasis (VVC), in order to better understand the epidemiology and pathogenesis of VVC.

**Study Design:** We analyzed 62 clinical isolates of *C. albicans* sequentially obtained from the anus and vagina of patients with sporadic and recurrent VVC. Evaluation of patient's demographic and clinical data, direct examination and colony forming units (CFU) counts of vaginal and anal samples were performed. The genotypes of strains were determined with ABC genotyping and Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD).

**Results:** Genotype A was the most prevalent (93.6%), followed by genotype C (6.4%), whereas genotype B was not found. We found the maintenance of the same ABC genotype, regardless of the body site of each patient. Most of the vaginal strains suffered microevolution, whereas most of the anal strains were replaced during the period of study. Vaginal and anal isolates of *C. albicans* obtained simultaneously from the same patient showed the same ABC genotype and high genetic similarity as determined by RAPD.

**Conclusion:** Genotype A seems to be dominant in both vaginal and anal isolates of patients with VVC. Our results corroborate with the hypothesis that there are "substrains" of the *C. albicans* vaginal clone successfully established, which dominates in an apparently random manner in the course of time. It is suggested that the anal reservoir constitutes a possible source for vaginal infection in most of the cases.

**Key words:** Vulvovaginal candidiasis, *Candida albicans*, Genotyping, Anal colonization.

## TEXT

### Introduction

Vulvovaginal candidiasis (VVC) is an infection of the vulva and vagina, caused by different species of the genus *Candida*<sup>1</sup>. Approximately 75% of women of reproductive age are affected by VVC<sup>2</sup>, whereas about 5% develop recurrent vulvovaginal candidiasis (RVVC), which is defined by the occurrence of three or more episodes of VVC per year<sup>3,4</sup>. Several authors report *Candida albicans* as the main etiological agent of VVC, accounting for 80-90% of cases, while 10 to 20% of them are caused by non-*C. albicans* *Candida* species, such as: *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* and *C. parapsilosis*.<sup>5-7</sup> Despite therapeutic advances, VVC has been considered a global public health problem, affecting millions of women of all social strata. It causes great discomfort, impairs sexual relationships and damages work performance.<sup>8,9</sup>

Different studies suggest the existence of clinical *C. albicans* strains with tropism for the vagina, since some genotypes predominantly found in patients with VVC are rarely present in other body sites<sup>10,11</sup>. It has also been determined a positive correlation between specific *C. albicans* genotypes and the severity of VVC, besides the recurrent condition. Therefore, the identification of specific genotypes of *C. albicans* related to the severity of VVC is of great importance for the diagnosis and treatment of this disease.<sup>10</sup>

Several studies have investigated the epidemiology of VVC. Nevertheless, the source of infection remains uncertain, with two main hypotheses for recurrent VVC: reinfection from reservoirs of extra genital sites such as the gastrointestinal tract or

through sexual transmission<sup>12-15</sup> and may be related to an incomplete eradication of the *Candida* strain from the vagina<sup>9</sup>. Therefore, further investigations are mandatory to elucidate the source of infection in women with recurrent VVC.

In a previous work performed by our group (unpublished data), we observed that patients colonized by *C. albicans* in the anus are about five times more likely to develop VVC<sup>16</sup>. Of note, it is widely believed that endogenous transmission through the gastrointestinal tract is the main source of vaginal yeasts.<sup>3</sup>

In this study, we evaluated clinical data, classical methods for the laboratorial diagnosis of VVC and molecular typing of *C. albicans* strains obtained from the vagina and anus of patients with probable VVC. We aimed to better understand the pathogenesis and the source of infection of the disease. This study will contribute for the discussion on the epidemiology of this clinical condition as well as to the investigation of genetic relatedness between vaginal and anal strains of *C. albicans* sequentially obtained from Brazilian patients. To the best of our knowledge, this is the first study evaluating genetic relatedness of *C. albicans* strains in this specific clinical scenario in Brazil.

## **Materials and methods**

### **Study population and strains**

We selected 25 strains of *C. albicans* of the mycological culture collection belonging to the Mycology Laboratory of the Giselda Trigueiro Hospital obtained between May 2003 and May 2005 (first period of study), while 37 strains of *C. albicans* were obtained from women who attended Januário Cicco Maternity School and

Integrated Clinical Analysis Laboratory, from the Federal University of Rio Grande do Norte, during November 2011 to August 2012 (second period of study, Table 1). Only patients who agreed to take part on a surveillance confidential study, in accordance to the Local Research Ethics committee from the University Hospital Onofre Lopes were enrolled in this study. The patients aged between 20 and 47 years and presented clinical symptoms compatible with VVC (vaginal discharge, itching, burning, dysuria, edema, erythema and/or dyspareunia). Seven patients had sporadic VVC, but did not respond to antifungal therapy, which allowed the obtaining of sequential strains, while 14 women had the recurrent condition, defined as three or more episodes of VVC per year. Patients with clinical evidence of any malignancy and/or AIDS were excluded from the study.

### **Sampling, culturing procedures and identification of yeasts**

Vaginal and anal secretions obtained from patients in the second period of study were collected with a sterile swab, subsequently placed in saline solution (0.9% w/v). Samples were subjected to direct examination and inoculated onto the surface of Sabouraud Dextrose Agar (SDA; Difco, USA) supplemented with 50 mg/ml of chloramphenicol (Ariston, Brazil) and 25 mg/mL of rose Bengal (Vetec, Brazil) for colony forming units (CFU) counts and also onto the surface of CHROMagar Candida (Difco, USA) to check for purity and colonies color. Petri dishes were incubated at 30 °C, for 48–96 h. The yeasts isolated were identified according to classical methods<sup>17</sup> and phenotypic identification was further confirmed with ABC genotyping.<sup>18</sup>

## DNA extraction, PCR and RAPD analysis

*C. albicans* strains actively growing overnight in YPD broth (yeast extract 10 g/L; dextrose 20g/L; peptone 20g/L) at 30°C were used for DNA extraction using PrepMan® Ultra Protocol according to the manufacturer's instruction (Applied Biosystems). A pair of primers that spans the site of the transposable intron in the 25S rDNA was used for ABC genotyping: CA-INT-L (5'-ATA AGG GAA GTC GGC AAA ATA GAT CCG TAA-3') and CA-INT-R (5'-CCT TGG CTG TGG TTT CGC TAG ATA GTA GAT-3'), according to Mccullough et al.<sup>18</sup>

A single primer B14 (5'-GATCAAGTCC-3') was used for RAPD analysis. Briefly, 1.0 µL of DNA 40 ng/µL, 2.5 µL of 10 x PCR buffer (100 mM tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 3.5 mM MgCl<sub>2</sub>), 5 µL of dNTPmix (100 mM each dNTP), 1.0 µL of primer (50 pmol/µL), 0.13 µL of tween 20 and 1.0 unit of Taq DNA polymerase were added to a final volume of 25 µL. The samples were amplified in a Thermocycler (Amplitherm, TX 96, Brazil) using the following cycling parameters: one initial cycle of 94°C for 5 min followed by 45 cycles of 30 s at 94°C, 1 min at 36°C, 2 min at 72°C and a final cycle of 10 min at 72°C. The PCR products were size-separated by agarose gel electrophoresis for an initial step of 30 min at 100 V followed by a period of 4.5 h at 55 V. The gel was stained in a 0.5 µg/mL ethidium bromide buffer solution (1 x tris-acetate-ethylenediamine tetraacetic acid). *C. albicans* SC5314 and ATCC 90028 were used as control strains for each PCR reaction.

## Computer-assisted RAPD data analysis

Gel images were analyzed with the GelCompar II software (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). The similarities between the profiles were calculated using the Dice

coefficient to generate the matrixes of similarity coefficients to dendrogram constructions. For profile clustering, the unweighted pair-group method with arithmetic averages (UPGMA) with a tolerance of 2% was used.

### **Statistical analysis**

For a comparison of the CFU counts between vaginal and anal secretion samples, the values of the number of CFU/mL of suspension of the samples obtained for each group were compared using Mann-Whitney t test using the statistical program GraphPad Prism (Graph Pad Software, San Diego, USA). A *P* value of < 0.05 was considered significant.

### **Results**

A total of 62 clinical isolates of *C. albicans* were included in the present study (Table 1). Thirty six isolates were obtained from vaginal secretion while 26 were isolated from the anus of the patients. In some occasions, it was possible to obtain a pair of isolates (vaginal and anal clinical strains obtained simultaneously from the same patient at the same time point), while in other occasions isolates were sequentially obtained (weekly or monthly) from either the vagina or the anus of the patients (Table 1).

The most prevalent symptom found was vaginal discharge, present in 26 occasions (96.3%) when positive vaginal cultures for *C. albicans* were obtained, followed by itching, observed in 19 occasions (70.4%). In all occasions observed (n = 27, 100%), the patients had active sex life, which was the most prevalent predisposing

factor, followed by pregnancy (n = 16, 59.3%) and the use of nylon underwear (n = 14, 51.9%, Table 2).

We found 100% (n=19) of correspondence between direct examination and culture of vaginal samples, while for anal secretion samples 93.7% (n=15) agreement was observed between direct examination and culture. Budding cells were the most prevalent fungal structures found in vaginal and anal secretions, present in 18 vaginal samples (94.7%) and nine anal samples (56.3%). Pseudohyphal cells and true hyphae were observed in most of the vaginal samples (n=14, 73.7%) and leucocytes were found in all vaginal samples.

Vaginal secretion samples showed significantly higher CFU counts than the anal secretion samples ( $P < 0.0001$ , Fig. 1). The evaluation of CFU counts obtained from vaginal samples sequentially obtained from the same patient, during the whole period of the study, led us to conclude that despite antifungal treatment (see Table 1) and some degree of remission of symptoms, we could not always detect a direct correlation for the decrease in the number of colonies during the period of the investigation (Fig. 2). Interestingly, we observed a trend of decreasing in CFU counts for the anal positive culture samples (Fig. 3).

Nevertheless, in one specific occasion, the reduction in CFU counts in sequential vaginal samples obtained from patient 07 was associated with good prognosis, because this patient was cured for VVC, while the increase in CFU counts of the vaginal samples from patient 14 correlated to poor prognosis, since there was a return of all symptoms of VVC in the last culture of this patient (Fig. 2).

Most of the isolates of *C. albicans* included in the study belonged to genotype A (n=58, 93.6%), while only four strains (6.4%), obtained from the same patient (patient

12), belonged to genotype C (Table 1). None of the clinical isolates belonged to genotype B or were identified as *C. dubliniensis* (genotype D).

We were able to find six different clusters with approximately 80% similarity between the isolates when RAPD genotyping was used (Fig. 4). In addition, the reference strains *C. albicans* ATCC90028 and SC5314, obtained from different geographic regions, were placed within totally different clusters (Fig. 4), being considered not related (less than 75% similarity). Therefore, this technique showed an efficient discriminatory power.

We could not detect any cluster enriched for either sporadic or recurrent VVC once most of the clusters were composed by isolates obtained from patients with the two different VVC conditions (Fig. 4).

Vaginal and anal strains obtained simultaneously from the same patient showed the same ABC genotype (Table 1) and high genetic similarity in most of the cases when RAPD was used (above 90% similarity, Table 3). Nevertheless, there were some occasions where the isolates were considered unrelated (less than 75% similarity, Table 3). For instance: strains 07 1CV and 07 1CA; 10 2CV and 10 2CA (Fig. 4).

Despite the fact that we could observe the maintenance of the same ABC genotype (Table 1), a trend to microevolution of the sequential vaginal strains isolated from the same patient during the whole period of the study was detected when RAPD technique was used (Table 4). In other words, the strain remains the same, however with minor changes observed by the presence of few different bands (similarity greater than 75%). Genetic microevolution was observed in vaginal strains obtained from patients 14, 30 and 94 in the first period of study and from patients 07 and 25 in the second period of study (Fig. 4).

Maintenance of the ABC genotype was also observed among sequential anal strains (Table 1). Nevertheless, when RAPD (better discriminatory power) was employed a trend to replacement of the anal strain in the course of time was detected (Table 4), as it can be observed for anal strains obtained from patients 10, 12, 14 and 20 in the second period of study (Fig. 4).

Interestingly, strains 58 1CV and 01 1CV, obtained from the same patient with RVVC in two distinct periods of study, collected at least six years apart, showed 100% similarity, indicating maintenance of the same infective vaginal strain (Fig. 4).

### **Comment**

Both the direct examination and culture are important in mycological diagnosis of VVC by *C. albicans*. It is noteworthy that the proliferation of yeast and bud-to-hypha transition are important in establishing VVC. In fact, the presence of filamentous structures has been associated with symptoms of VVC.<sup>19</sup> Our results relative to CFU counts demonstrate the lack of association between the concentration of *Candida* spp. in vagina with the clinical condition presented by patients with VVC, as observed by other authors,<sup>20-22</sup> although the increase or decrease in CFU counts were related to poor or good prognosis, respectively. The reduction observed in CFU counts for sequential anal samples from the same patient in the course of time is probably related to some degree of action of antifungal agents to treat VVC, due to the anatomic proximity of the lower gastrointestinal tract to the lower genital female tract.

Genotype A seems to be dominant over the other ABC genotypes in both vaginal and anal isolates of patients with VVC. Our results corroborate with the theory that the genotype A of *C. albicans* is the most prevalent worldwide, which was also observed in

several other studies evaluating clinical isolates of *C. albicans* from various anatomical sites and different geographic regions by ABC genotyping.<sup>23-32</sup>

We found by RAPD genotyping several distinct genotypes causing VVC, although most of the isolates were clustered into only two groups (cluster 4 e cluster 5), suggesting the dominance of particular genotypes of *C. albicans* causing VVC and colonizing the anal mucosa of patients with VVC, corroborating with the results from studies conducted in China.<sup>10-12,33</sup>

Other studies also have shown high genetic similarity among isolates of *C. albicans* obtained simultaneously from the vagina and anus in women with VVC.<sup>34-36</sup> It is suggested that probably the vaginal pathogenic strains are maintained in the anal reservoir which in most the cases is the source of infection, although we found vaginal and anal strains genetically unrelated in a few cases, suggesting the existence of different strains causing vaginal infection and colonizing the anus.

Several studies have evaluated the genetic relationship between vaginal isolates of *Candida* spp. sequentially obtained from patients with RVVC, verifying three different conditions as the most frequent scenario: strains maintenance,<sup>35, 37</sup> microevolution<sup>38-40</sup> or replacement in the course of time.<sup>41</sup>

In our study, the most common scenario was microevolution of the strains of *C. albicans* in the vaginal environment, cooperating with the hypothesis that there are "substrains" of the clone established, which dominate in apparently random manner during the establishment of infection.<sup>40</sup>

To the best of our knowledge, no studies have evaluated the genetic relationship of anal isolates sequentially obtained of patients with VVC. In our study, we observed that these isolates have a tendency to be replaced, contrary to what was found with

regard to vaginal isolates, but consistent to the higher genetic heterogeneity found in colonization sites as compared to sites of infection.<sup>27,33</sup>

Our results suggest no association between the genotype presented by the strain of *C. albicans* and the clinical condition of the patient (sporadic or recurrent VVC), confirming the results reported by Lian et al.<sup>42</sup>

ABC genotyping showed lower discriminatory power than RAPD. In fact, the ABC genotyping technique allows differentiating *C. albicans* in only three distinct genotypes, with relatively little discrimination towards other methodologies (microsatellites, RAPD, Multilocus Sequence Typing). We stress the importance of using different genotyping techniques for assessing the genetic relationships between clinical isolates of *C. albicans*, aiming to obtain more reliable results.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to FAPERN/Brazil (Grant 013/2009) for financial support and to Professor Arnaldo Lopes Colombo for the donation of *Candida albicans* control strains (ATCC 90028 and SC5314).

## REFERENCES

1. Fidel Jr. PL. Distinct protective host defenses against oral and vaginal candidiasis. *Med Mycol* 2002;40:359-75.
2. Sobel JD. Pathogenesis and epidemiology of vulvovaginal candidiasis. *Ann NY Acad Sci* 1988;544: 547–57.
3. Fidel Jr. PL, Sobel JD. Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Rev Clin Microbiol* 1996;9:335-48.
4. Mårdh PA, Rodrigues AG, Genç M, Novikova N, Martinez-de-Oliveira J, Guaschino S. Facts and myths on recurrent vulvovaginal candidosis: a review on epidemiology, clinical manifestations, diagnosis, pathogenesis and therapy. *Int J STD AIDS* 2002; 13:522-39.
5. Dan M, Poch F, Levin D. High rate of vaginal infections caused by non-*C. albicans* species among asymptomatic women. *Medical Mycology* 2002;40:383-86.
6. Ferrazza MSHS, Márcia LFM, Marcia ELC, Cristiane SS, Terezinha IES, Márcia RB. Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* 2005;27:58-63.

7. Sobel JD. Pathogenesis and treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis. *J Infect Dis* 1992;14Suppl1:S148-53.
8. Kent HL. Epidemiology of vaginitis. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165:1168 – 75.
9. Sobel JD. Epidemiology and pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Am J Obstet Gynecol* 1985;152:924–35.
10. Fan SR, Bai FY, Liao QP, Liu ZH, Li J, Liu XP. Genotype distribution of *Candida albicans* strains associated with different conditions of vulvovaginal candidiasis, as revealed by microsatellite typing. *Sex Transm Infect* 2008;84:103–6.
11. Li J, Bai FY. Single-strand conformation polymorphism of microsatellite for rapid strain typing of *Candida albicans*. *Med Mycol* 2007;45:629–35.
12. Li J, Fan SR, Liu XP et al. Biased Genotype Distributions of *Candida albicans* Strains Associated with Vulvovaginal Candidosis and Candidal Balanoposthitis in China. *Clinical Infectious Diseases* 2008;47:1119–25.
13. Mårdh PA, Novikova N, Stukalova E. Colonisation of extragenital sites by *Candida* in women with recurrent vulvovaginal candidosis. *Br J Obstet Gynaecol* 2003;110:934–7.
14. Miles MR, Olsen L, Rogers A. Recurrent vaginal candidiasis. Importance of an intestinal reservoir. *JAMA* 1977;238:1836–7.

15. Schroppel K, Rotman M, Rudolph G, Mac K, Soll DR. Evolution and Replacement of *Candida albicans* Strains during Recurrent Vaginitis Demonstrated by DNA Fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology* 1994;32:2646-54.
16. Holanda AAR, Fernandes ACS, Bezerra CM et al. Candidíase vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* 2007;29:3-9.
17. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: Kurtzman CP, Fell JW, eds. *The Yeasts, a taxonomic study*. 4ª edição. Amsterdam: Elsevier Science B. V.; 1998: 77-100.
18. Mccullough MJ, Clemons KV, Stevens DA. Molecular and phenotypic characterization of genotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea*. *J Clin Microbiol* 1999;37:417-21.
19. Ferrer J. Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 2000;71:21-7.
20. Consolaro MEL, Albertoni TA, Yoshida CS, Mazucheli J, Peralta RM, Svidzinski TIE. Correlation of *Candida* species and symptoms among patients with vulvovaginal candidiasis in Maringá, Paraná, Brazil. *Rev Iberoam Micol* 2004;21:202-5.

21. Giraldo P, Von Nowaskonski A, Gomes FA, Linhares I, Neves NA, Witkin SS. Vaginal colonization by *Candida* in asymptomatic women with and without a history of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Obstet Gynecol* 2000;95:413-6.
22. Linhares IM, Giraldo PC, Caetano ME, Nissan MD, Gonçalves AKS, Giraldo HPD. Candidíase vulvovaginal recorrente: Fisiopatogênese, diagnóstico e tratamento. *Ver Ciênc Méd* 2005;14: 373-8.
23. Adachi H, Shimizu K, Hattori H et al. Genotyping of *Candida albicans* by Fragment Analysis of Microsatellites Combined with 25S rDNA and RPS-based Strategies. *J Med Mycol* 2009;50:167-74.
24. Balaban N, Karahan ZC, Mumcuoğlu I, Cayirli A, Kuştimur S. The relationship between *Candida albicans* 25S intron genotypes and antifungal susceptibilities. *Mikrobiyol Bul* 2007;41:245-51.
25. Emmanuel NN, Romeo O, Mebi AG et al. Genotyping and fluconazole susceptibility of *Candida albicans* strains from patients with vulvovaginal candidiasis in Jos, Nigeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 2012;48-50.
26. Iwata T, Hattori H, Chibana H et al. Genotyping of *Candida albicans* on the basis of polymorphisms of ALT repeats in the repetitive sequence (RPS). *Journal of Dermatological Science* 2006;41:43-54.

27. Jacobsen MD, Duncan AD, Bain J et al. Mixed *Candida albicans* strain populations in colonized and infected mucosal tissues. *FEMS Yeast Res* 2008;8:1334–8.
28. Karahan, ZC, Guñeriz H, Ağırbaşlı H et al. 25S intron analysis followed by restriction enzyme digestion performed for genotyping *Candida albicans* isolates. *Mikrobiyol Bul* 2012;46: 257-65.
29. Millar BC, Moore JE, Xu J, Walker MJ, Hedderwick S, McMullan R. Genotypic subgrouping of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by 25S intron analysis. *Letters in Applied Microbiology* 2002;35:102–6.
30. ODDS FC, Davidson AD, Jacobsen MD et al. R. *Candida albicans* Strain Maintenance, Replacement, and Microvariation Demonstrated by Multilocus Sequence Typing. *Journal of Clinical Microbiology* 2006;44:3647–58.
31. Odds FC, Bognoux ME, Shaw DJ et al. Molecular Phylogenetics of *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* 2007;6:1041–52.
32. Tamura M, Watanabe K, Mikami Y, Yazawa K, Nishimura K. Molecular Characterization of New Clinical Isolates of *Candida albicans* and *C. dubliniensis* in Japan: Analysis Reveals a New Genotype of *C. albicans* with Group I Intron. *Journal of Clinical Microbiology* 2001;4309–15.

33. Ge S, Xie J, Xu J et al. Prevalence of specific and phylogenetically closely related genotypes in the population of *Candida albicans* associated with genital candidiasis in China. *Fungal Genetics and Biology* 2012;49:86–93.
34. Lin XL, Li Z, Zuo XL. Study on the relationship between vaginal and intestinal candida in patients with vulvovaginal candidiasis. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2011; 46:496-500.
35. Sampaio P, Gusmão L, Alves C, Pina-Vaz C, Amorim A, Pais C. Highly polymorphic microsatellite for identification of *Candida albicans* strains. *J Clin Microbiol* 2003;41:552–7.
36. Shi W, Mei X, Gao F et al. Analysis of genital *Candida albicans* infection by rapid microsatellite markers genotyping. *Chinese Medical Journal* 2007;120: 975-80.
37. Sampaio P, Gusmão L, Correia A et al. New Microsatellite Multiplex PCR for *Candida albicans* Strain Typing Reveals Microevolutionary Changes. *Journal of Clinical Microbiology* 2005;43: 3869 – 76.
38. Chong PP, Lee YL, Tan BC, Ng KP. Genetic relatedness of *Candida* strains isolated from women with vaginal candidiasis in Malaysia. *Journal of Medical Microbiology* 2003; 52:657–66.

39. Chong PP, Hadi SRA, Lee YL et al. Genotyping and drug resistance profile of *Candida* spp. In recurrent and one-off vaginitis, and high association of non-albicans species with non-pregnant status. *Infection, Genetics and Evolution* 2007;7:449–56.
40. Lockhart SR, Reed BD, Pierson CL, Soll DR. Most Frequent Scenario for Recurrent *Candida* Vaginitis Is Strain Maintenance with “Substrain Shuffling”: Demonstration by Sequential DNA Fingerprinting with Probes Ca3, C1, and CARE2. *Journal of Clinical Microbiology* 1996;767–77.
41. Amouri I, Sellami H, Abbes S et al. Microsatellite analysis of *Candida* isolates from recurrent vulvovaginal candidiasis. *J Med Microbiol* 2012.
42. Lian C, Zhao J, Zhang Z, Liu W. Genotype of *Candida* species associated with different conditions of vulvovaginal candidosis. *Mycoses* 2004;47:495–502.
43. Soll DR. The Ins and Outs of DNA Fingerprinting the Infectious Fungi. *Clinical Microbiology Reviews* 2000;13:332-70.

## TABLES

Table 1 – Strains of *C. albicans* obtained from patients with VVC included in this study.

Patient	Clinical condition	Isolate number	Anatomical site	Interaction with the host	ABC typing	Antifungal Treatment <sup>a</sup>	Period of collection
07	Recurrent	07 1CV	Vagina	Infection	A	Data unavailable	
		07 1CA	Anus	Colonization	A	Data unavailable	
		14 3CV	Vagina	Infection	A	Data unavailable	
14	Recurrent	14 4CV	Vagina	Infection	A	Data unavailable	
		14 1CA	Anus	Colonization	A	Data unavailable	
		30 2CV	Vagina	Infection	A	Data unavailable	
30	Recurrent	30 3CV	Vagina	Infection	A	Data unavailable	
		30 6CV	Vagina	Infection	A	Data unavailable	
		56 3CV	Vagina	Infection	A	Data unavailable	
56	Recurrent	56 3CA	Anus	Colonization	A	Data unavailable	
58	Recurrent	58 1CV	Vagina	Infection	A	Data unavailable	May 2003
60	Recurrent	60 1CV	Vagina	Infection	A	Data unavailable	to
		60 1CA	Anus	Colonization	A	Data unavailable	May 2005
61	Recurrent	61 2CV	Vagina	Infection	A	Data unavailable	(First period
		61 2CA	Anus	Colonization	A	Data unavailable	of study) <sup>b</sup>
70	Recurrent	70 1CV	Vagina	Infection	A	Data unavailable	
		70 1CA	Anus	Colonization	A	Data unavailable	
78	Recurrent	78 1CV	Vagina	Infection	A	Data unavailable	
		78 1CA	Anus	Colonization	A	Data unavailable	
81	Recurrent	81 2CV	Vagina	Infection	A	Data unavailable	
		81 3CA	Anus	Colonization	A	Data unavailable	
83	Recurrent	83 1CV	Vagina	Infection	A	Data unavailable	
		83 1CA	Anus	Colonization	A	Data unavailable	
94	Recurrent	94 1CV	Vagina	Infection	A	Data unavailable	
		94 4CV	Vagina	Infection	A	Data unavailable	
01	Recurrent	01 1CV (LMMM 45)	Vagina	Infection	A	Fluconazole <sup>d, f</sup>	November
05	Sporadic	05 1CV (LMMM 52)	Vagina	Infection	A	None	2011
		05 1CA (LMMM 53)	Anus	Colonization	A	None	to
		07 1CV (LMMM 56)	Vagina	Infection	A	None	August
07	Sporadic	07 1CA (LMMM 57)	Anus	Colonization	A	None	2012
		07 2CV (LMMM 62)	Vagina	Infection	A	Clotrimazole <sup>d, g</sup>	(Second
		07 2CA (LMMM 63)	Anus	Colonization	A	Clotrimazole <sup>d, g</sup>	period of

		07 3CV (LMMM 66)	Vagina	Infection	A	Miconazole <sup>c, g</sup>	study)
		07 3CA (LMMM 68)	Anus	Colonization	A	Miconazole <sup>c, g</sup>	
		10 1CV (LMMM 72)	Vagina	Infection	A	None	
		10 2CV (LMMM 90)	Vagina	Infection	A	Nystatin <sup>e, h</sup>	
<b>10</b>	Sporadic	10 2CA (LMMM 91)	Anus	Colonization	A	Nystatin <sup>e, h</sup>	
		10 3CV (LMMM 99)	Vagina	Infection	A	None	
		10 3CA (LMMM 100)	Anus	Colonization	A	None	
		12 1CV (LMMM 74)	Vagina	Infection	C	None	
<b>12</b>	Sporadic	12 1CA (LMMM 75)	Anus	Colonization	C	None	
		12 2CV (LMMM 92)	Vagina	Infection	C	Nystatin <sup>e, h</sup>	
		12 2CA (LMMM 93)	Anus	Colonization	C	Nystatin <sup>e, h</sup>	
<b>13</b>	Sporadic	13 1CV (LMMM 76)	Vagina	Infection	A	None	
		13 1CA (LMMM 77)	Anus	Colonization	A	None	
		14 1CV (LMMM 88)	Vagina	Infection	A	Nystatin <sup>e, h</sup>	
		14 1CA (LMMM 89)	Anus	Colonization	A	Nystatin <sup>e, h</sup>	
		14 2CV (LMMM 94)	Vagina	Infection	A	Nystatin <sup>e, h</sup>	
<b>14</b>	Sporadic	14 2CA (LMMM 95)	Anus	Colonization	A	Nystatin <sup>e, h</sup>	
		14 3CV (LMMM 96)	Vagina	Infection	A	Nystatin <sup>c, h</sup>	
		14 3CA (LMMM 97)	Anus	Colonization	A	Nystatin <sup>c, h</sup>	
		14 4CV (LMMM 98)	Vagina	Infection	A	Nystatin <sup>c, h</sup>	
		20 1CV (LMMM 102)	Vagina	Infection	A	Myconazole <sup>d, g</sup>	
<b>20</b>	Sporadic	20 1CA (LMMM 103)	Anus	Colonization	A	Myconazole <sup>d, g</sup>	
		20 4CV (LMMM 193)	Vagina	Infection	A	None	
		20 4CA (LMMM 194)	Anus	Colonization	A	None	
		25 1CV (LMMM 115)	Vagina	Infection	A	Fluconazole <sup>e, f</sup>	
<b>25</b>	Recurrent	25 1CA (LMMM 117)	Anus	Colonization	A	Fluconazole <sup>e, f</sup>	
		25 2CV (LMMM 200)	Vagina	Infection	A	Fluconazole <sup>c, f</sup>	
		25 2CA (LMMM 201)	Anus	Colonization	A	Fluconazole <sup>c, f</sup>	
<b>27</b>	Recurrent	27 1CV (LMMM 162)	Vagina	Infection	A	None	
		27 1CA (LMMM 163)	Anus	Colonization	A	None	

<sup>a</sup> Data concerning the use of antifungal drugs up to a month previously to the time of collection; <sup>b</sup> Antifungal treatment was instituted after the first collection in the first period of study, but data on the antifungal drug is not available; <sup>c</sup> Currently under antifungal therapy; <sup>d</sup> Administration of antifungal drugs for less than 10 days; <sup>e</sup> Administration of antifungal drugs for less than a month; <sup>f</sup> Oral administration of 150 mg tablet, single dose; <sup>g</sup> Topical administration of vaginal cream during seven days; <sup>h</sup> Topical administration of vaginal cream during 14 days; 1C: First collection; 2C: Second collection; 3C: Third collection; 4C: Fourth collection; 6C: Sixth collection; LMMM: Laboratório de Micologia Médica e Molecular.

Table 2 – Clinical manifestations and predisposing factors presented by patients included in this study

Clinical manifestation	n <sup>a</sup> (%)
Vaginal discharge	26 (96.3%)
Itching	19 (70.4%)
Erythema	13 (48.1 %)
Dyspareunia	11 (40.7 %)
Burning <sup>b</sup>	6 (35.3 %)
Edema	7 (25.9 %)
Dysuria	6 (22.2 %)
Predisposing factor	n <sup>a</sup> (%)
Active sex life	27 (100%)
Pregnancy	16 (59.3%)
Nylon underwear	14 (51.9 %)
Tight clothes	11 (40.7 %)
Allergy	7 (25.9 %)
Contraceptive	5 (18.5 %)
Tampon	5 (18.5 %)
Diabetes	4 (14.8 %)
Antibiotic therapy (last 30 days)	1 (3.7 %)
Intrauterine device	1 (3.7 %)
Others	0

<sup>a</sup> Number of occasions where the clinical manifestation or predisposing factor was present when positive vaginal cultures for *C. albicans* were obtained (27 occasions in total). <sup>b</sup> Data obtained only for the second period of study in 17 occasions in total.

Table 3 - Distribution of pair of strains (vaginal and anal strain) of *C. albicans* according to the degree of genetic relatedness

Level of genetic relatedness (RAPD genotyping)	Genetic similarity (%)	Number of pair of strains (vaginal and anal strain)
		n (%)
<b>Unrelated</b>	≤ 75%	4 (16.7%)
<b>Moderately related</b>	≈ 80%	5 (20.8%)
<b>Highly related</b>	≈ 90%	12 (50%)
<b>Identical</b>	100%	3 (12.5%)

Classification of genetic relatedness according to SOLL<sup>43</sup>.

Table 4 - Distribution of sequential isolates of *C. albicans* according to the degree of genetic alteration during the course of time.

Level of genetic alteration (RAPD genotyping)	Vaginal sequences	Anal sequences
	n (%)	n (%)
<b>Replacement</b>	4 (44.4%)	4 (66.7%)
<b>Microevolution</b>	5 (55.6%)	2 (33.3%)
<b>Maintenance</b>	0 (0%)	0 (0%)

## FIGURE LEGENDS

Figure 1 – Comparison of the number of colony forming units (CFU) of *C. albicans* among vaginal and anal clinical samples

CFU counts of vaginal and anal secretions obtained from patients with symptoms compatible with VVC, determined after 96 h incubation at 30 ° C on SDA. Each bar represents the mean  $\pm$  SD of the results obtained for all the isolates of each group. \* =  $P < 0.0001$  (Mann-Whitney t-test comparing the vaginal samples with anal samples regarding the number of CFU).

Figure 2 - Number of colony forming units (CFU) of *C. albicans* observed for sequential vaginal samples

CFU counts of vaginal secretion samples sequentially obtained from patients with symptoms compatible with VVC, determined after 96 h incubation at 30 ° C on SDA.

Figure 3 - Number of colony forming units (CFU) of *C. albicans* present in sequential anal samples

CFU counts of anal secretion samples sequentially obtained from patients with symptoms compatible with VVC, determined after 96 h incubation at 30 ° C on SDA.

Figure 4 – Clustering of *C. albicans* strains based on genetic similarity

Dendrogram generated by GelComparII program using the UPGMA method concerning the banding patterns generated by amplification using the primer B14. The reference strains ATCC 90028 and SC5314 are highlighted. Strains identified by isolate number and clinical condition. Clustering based on similarity of around 80%.

## FIGURES

Figure 1

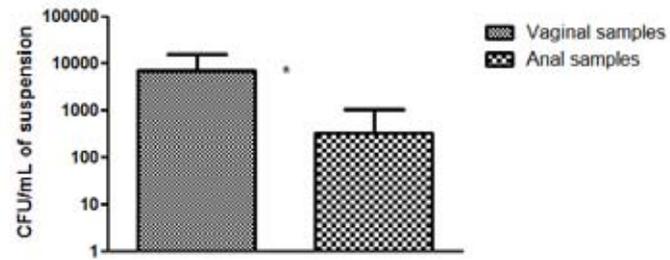


Figure 2

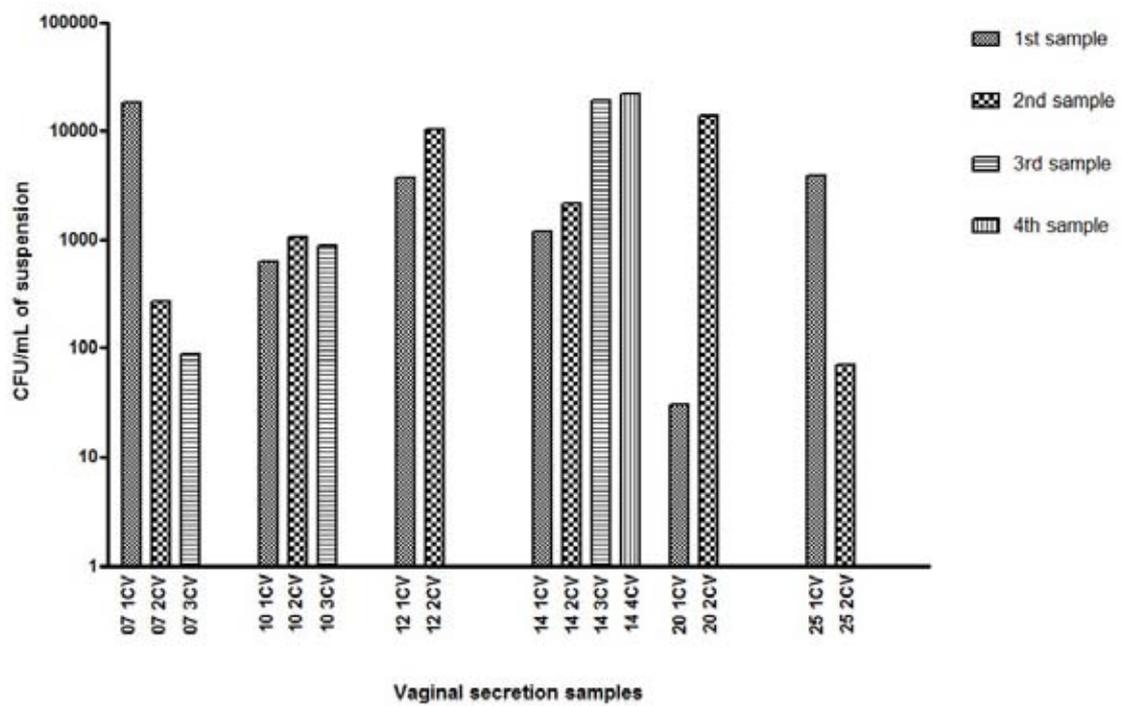


Figure 3

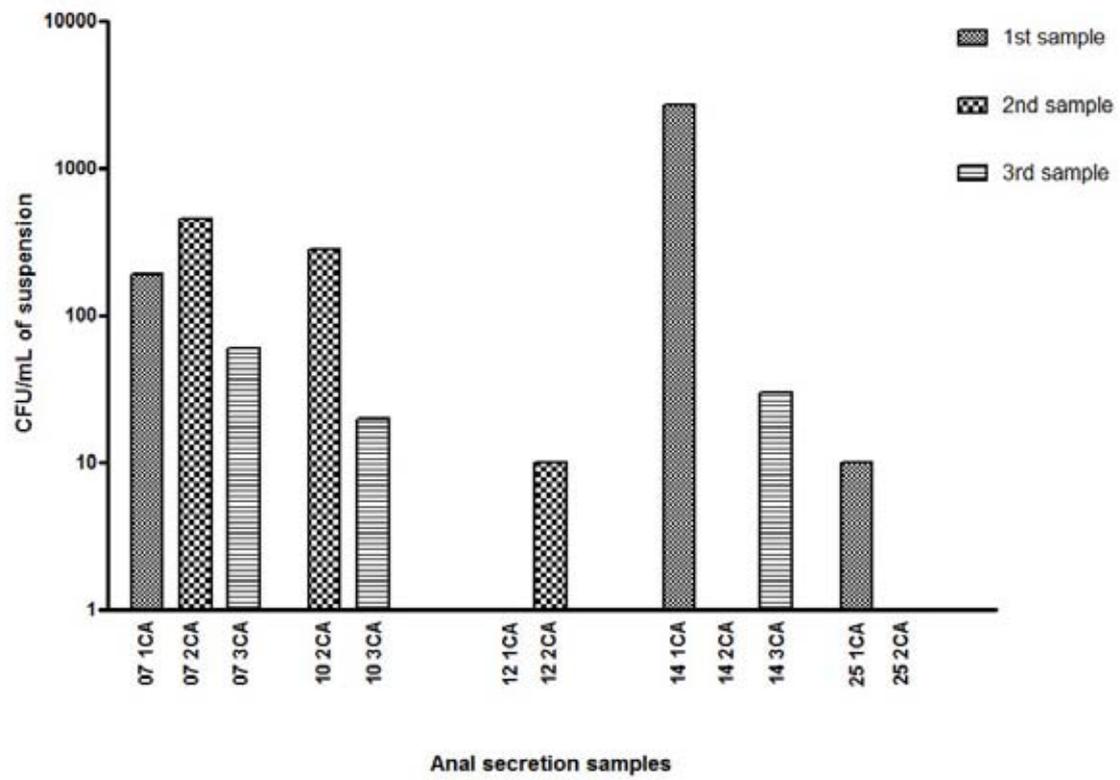
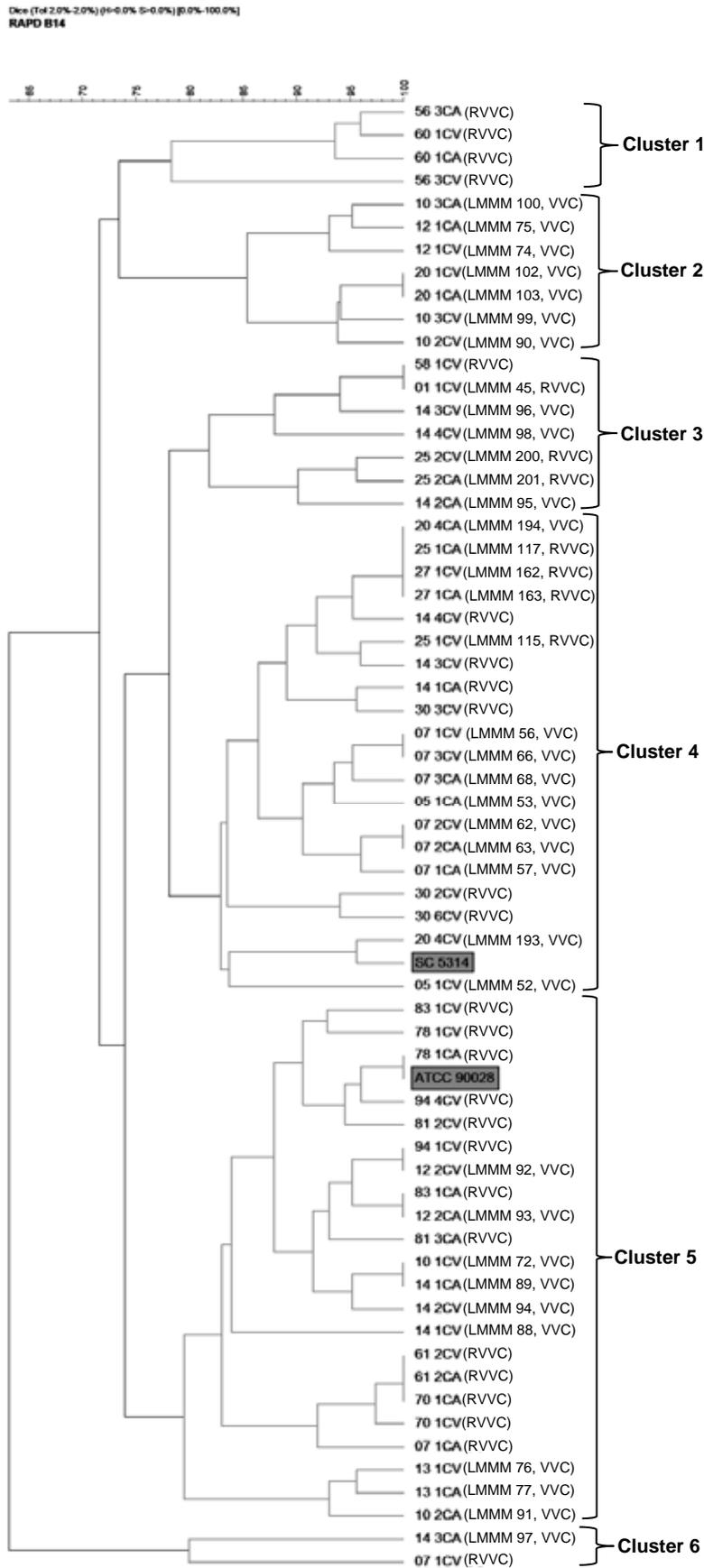


Figure 4



## ANEXO A



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO ONOFRE  
LOPES – CEP/HUOL

## CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Onofre Lopes – CEP/HUOL, devidamente reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP/MS, analisou o projeto:

**Título: Caracterizações genotípicas e fenotípicas de isolados clínicos de Candida Albicans oriundos de pacientes sãs e com Candidíase Vulvovaginal**

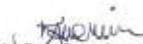
**Protocolo CEP/HUOL: 595/11**

**CAAE: 1317.0.000.294-11**

**Pesquisador Responsável: Guilherme Maranhão Chaves**

Este projeto foi aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, incluindo o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as diretrizes da Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde, em reunião plenária realizada dia 04 de Novembro de 2011 no CEP/HUOL. Toda e qualquer alteração no projeto/protocolo de pesquisa, assim como eventos adversos que venham a ocorrer, deverão ser comunicados oficialmente e imediatamente ao CEP/HUOL. O relatório final do projeto ou a cópia de sua publicação deverá ser encaminhado ao CEP/HUOL após o término do estudo, conforme cronograma.

Natal, 07 de Novembro de 2011.

  
**Karla Patrícia Cardoso Amorim**  
Coordenadora do CEP/HUOL