

UFT
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS DO AMBIENTE

ROSA MARIA MACHADO DE SENA

**ATIVIDADE *KILLER* DE *CANDIDA ALBICANS* ASSOCIADA À
CANDIDÍASE VULVOVAGINAL E FATORES SÓCIO-AMBIENTAIS
RELACIONADOS**

PALMAS – TO
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ROSA MARIA MACHADO DE SENA

**ATIVIDADE *KILLER* DE *CANDIDA ALBICANS* ASSOCIADA À
CANDIDÍASE VULVOVAGINAL E FATORES SÓCIO-AMBIENTAIS
RELACIONADOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências do Ambiente da Universidade Federal do Tocantins, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências do Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Aparecido Osdimir Bertolin

PALMAS – TO
2007

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca da Universidade Federal do Tocantins
Campus Universitário de Palmas**

S474a Sena, Rosa Maria Machado de
Atividade *killer* de *Candida albicans* associada à candidíase vulvovaginal em Araguaína - TO e fatores sócio-ambientais relacionados / Rosa Maria Machado de Sena - Palmas, 2007.
62 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Tocantins, Mestrado em Ciências do Ambiente, 2007.
Orientador: Prof. Dr. Aparecido Osdimir Bertolin

1. Candidíase vulvovaginal. 2. Toxinas *Killer* 3. *Candida albicans*. I. Título.

CDU 504

**Bibliotecário: Heloisa dos Santos Brasil
CRB-2 / 1158**

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

TERMO DE APROVAÇÃO**ROSA MARIA MACHADO DE SENA****ATIVIDADE *KILLER* DE *CANDIDA ALBICANS* ASSOCIADA À
CANDIDÍASE VULVOVAGINAL E FATORES SÓCIO-AMBIENTAIS
RELACIONADOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Tocantins, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências do Ambiente.

Aprovada em: 22 de setembro de 2007.

BANCA EXAMINADORA

Presidente: _____

Prof. Dr. Aparecido Osdimir Bertolin
UFT

1º Examinador: _____

Profª Drª. Nanci do Nascimento
IPEN – USP

2º Examinador: _____

Profª Drª. Liliana Pena Naval
UFT

Palmas - TO, 22 de setembro de 2007.

DEDICATÓRIA

À D. Penha e ao Sr. Bernardino,

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Aparecido Osdimir Bertolin, pela orientação, amizade e apoio durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Francisco Baptista, pelas importantes considerações durante a elaboração deste estudo, sobretudo na parte epidemiológica.

Ao Prof. Dr. Luiz Cláudio Ribeiro, pela ajuda na análise estatística.

À Universidade Federal do Tocantins e à Capes, pela oportunidade de realizar um sonho.

Aos Laboratórios de Microbiologia Ambiental e Saúde Pública da UFT de Porto Nacional, pela oportunidade de desenvolvimento da parte experimental.

À Secretaria Municipal de Saúde Araguaína, por permitir o desenvolvimento desta pesquisa nos Postos de Saúde.

À Fundação de Medicina Tropical do Tocantins, pelo financiamento de parte dos materiais e pela oportunidade de trabalhar em uma Instituição de Pesquisa.

Ao ITPAC, pela cessão do Laboratório de Microbiologia e pela flexibilização de meu horário de trabalho, sem o qual não seria possível a realização do Mestrado.

À Prof^a Dr^a. Claudete Rodrigues de Paula do ICB – USP, pela cessão de linhagens utilizadas neste trabalho.

Às professoras Dr^a. Maria Librada e Otávia Borges pelo apoio dado.

Aos colegas da FMT pelo apoio na realização deste projeto.

Às mulheres de Araguaína que disponibilizaram seus tempos e corpos, para que esse trabalho pudesse ser concretizado.

Às enfermeiras e enfermeiros que participaram ativamente desse projeto, pelo apoio, e minha admiração pelo profissionalismo e carinho no exercício de suas profissões.

À Elke Bonamigo, pelo importante apoio na parte experimental.

À Ludymilla e Viviane pela ajuda essencial nos ensaios laboratoriais.

Às técnicas da FMT Denise e Carmem e ao estagiário Nygell, pelo importante apoio na fase inicial dos experimentos.

Aos técnicos do ITPAC, em especial à Guaracy, Márcia e Gil pela inestimável ajuda nos trabalhos laboratoriais.

À Meiryvan, pelo apoio na Coordenação dos Laboratórios, nos momentos em que estive ausente.

Aos professores do Mestrado em Ciências do Ambiente da UFT, pela dedicação e por compartilhar seus conhecimentos.

À Fernanda Villibor, pela amizade e apoio em tantos momentos que precisei.

Ao Dr. Élvio, pelo incentivo inicial, constante apoio e amizade.

À Cida e Meirilane, pela amizade e por compartilhar os momentos difíceis dessa trajetória, sempre torcendo por meu sucesso.

À D.Penha, minha querida mãe, pela oração, torcida e acolhida e aos meus familiares Roque, Robinson, Meire, Carlos e Henrique que, mesmo distantes, me incentivaram.

À Sueli e João Milton, por todo apoio, sobretudo nos momentos difíceis depois do acidente.

Ao André, por sempre me incentivar a lutar, por acreditar em mim, por ser meu irmão e amigo.

À Mary, minha irmã do Tocantins, pelo imenso apoio, amizade e presença, sobretudo nos momentos mais difíceis.

À Lígia, pelo carinho, amizade, orações e por ceder seu espaço para os meus livros...

À Keile, uma alma boa, que, junto com sua família, tantas vezes me acolheu.

Ao Miguel, que por tanto amar este estado, me trouxe para o Tocantins.

A todos aqueles, que eu não citei, mas mesmo sem falar, torceram e rezaram por mim, meus agradecimentos...

Rosa

EPIGRAFE

“Sem o esforço da busca é impossível a alegria do encontro”

Autor desconhecido

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 JUSTIFICATIVA	13
1.2 HIPÓTESES.....	14
1.2 OBJETIVOS	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 BIOATIVOS NATURAIS	15
2.2 INFECÇÕES FÚNGICAS E CANDIDÍASES	15
2.3 CANDIDÍASE VULVOVAGINAL	17
2.3.1 O habitat vaginal	18
2.3.2 Colonização vaginal e candidíase	22
2.3.3 Imunidade do hospedeiro	24
2.4 O CARÁTER <i>KILLER</i>	25
2.4.1 Ecologia do caráter <i>Killer</i>	27
3 METODOLOGIA	30
3.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	30
3.2 TIPO DE ESTUDO	30
3.3 LOCAL	30
3.4 SUJEITOS.....	30
3.4.1 Número de indivíduos.....	30
3.4.2 Critérios de inclusão e exclusão.....	31
3.5 QUESTIONÁRIO	31
3.6 EXPERIMENTOS	31
3.6.1 Coletas de amostras	31
3.6.2 Isolamento e identificação das leveduras.....	32
3.6.3 Teste de atividade (AK) e de sensibilidade <i>killer</i> (SK).....	33
3.7 EPIDEMIOLOGIA E ESTATÍSTICA	33
3.8. PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES.....	34
3.8.1 CHROMagar® Candida	34
3.8.2 Meio YEPD.....	34
3.8.3 Meio YEPD- azul de metileno tamponado - BMB.....	34
3.8.4 Tampão Citrato-Fosfato.....	35

3.8.5 Solução de azul de metileno	35
3.8.6 Solução de Cloreto de Sódio 0,85% p/v	35
3.8.7 Esterilização	35
3.9 CONTROLES	36
3.9.1 Leveduras padrão	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 PREVALÊNCIA DE VULVOVAGINITES POR LEVEDURAS.....	37
4.1.2 Leveduras isoladas de vulvovaginites em CHROMagar Candida	37
4.2 INFECÇÃO MISTA.....	40
4.2.1 Infecção mista e atividade <i>killer</i>	41
4.3 FATORES PESSOAIS E SÓCIO - AMBIENTAIS RELACIONADOS ÀS LEVEDUROSES VULVOVAGINAIS	43
4.3.1 Idade, renda e moradia	45
4.4 ATIVIDADE E SENSIBILIDADE <i>KILLER</i>	46
4.4.1 Atividade <i>killer</i> e temperatura	49
4.7 SENSIBILIDADE <i>KILLER</i> DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	53
5 CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS.....	56
APÊNDICES
ANEXOS

RESUMO

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma infecção micótica oportunista da vagina e áreas adjacentes, causada principalmente por *Candida albicans* e leveduras relacionadas. Trata-se de problema de saúde pública, pois acomete 75% das mulheres em idade fértil em pelo menos uma vez na vida, podendo haver recorrência. Este estudo, do tipo transversal prospectivo, verificou a atividade *killer in vitro* de *Candida albicans* (CA) sobre CVV; estudou parâmetros biológicos destas inter-relações e inferiu fatores pessoais e/ou sócio-ambientais associados à prevalência de vulvovaginites micóticas. As secreções vaginais de 106 voluntárias com sinais e sintomas de CVV foram submetidas ao isolamento no meio de cultura CHROMagar Candida. As colônias de CA isoladas foram testadas quanto à atividade (AK) e sensibilidade (SK) às toxinas *killer* em meio YEPD azul de metileno. Questionários foram aplicados objetivando inferir fatores relacionados à CVV. Os resultados foram submetidos a análises estatísticas descritivas, aos testes do qui-quadrado e Fisher com 5% de significância. *Candida albicans* e espécies não-*albicans* cresceram em culturas de 38,68% das voluntárias. CA isoladas de CVV demonstraram atividade *killer in vitro* sobre CVV, havendo linhagens com AK superior às leveduras *killer* de Polonelli; idade, hábitos pessoais e sócio-ambientais apresentaram relação com a prevalência de CVV. Com a metodologia empregada, pôde-se concluir que a atividade *killer in vitro* pode se manifestar em condições de pH e temperatura fisiológicos; fatores sócio-ambientais relacionam-se às CVV; a prevalência de espécies não-*albicans* apresenta características de emergência. Mais estudos são necessários a fim de se purificar e estudar a toxicidade e a atividade das toxinas *killer* de *C. albicans in vivo*, que provavelmente, possuirão tal atividade em condições fisiológicas.

Palavras-chave: Candidíase vulvovaginal, prevalência, toxinas *killer*, *Candida* não-*albicans*, hábitos.

ABSTRACT

Vulvovaginal candidiasis (VVC) is an opportunistic fungal infection in the vagina and adjoining areas caused primarily by *Candida albicans* (CA) and related yeasts. This is a public health care problem, provided that affects 75% of women of childbearing age at least once in a lifetime, with possible recurrence. This transversal prospective work studied the biological parameters of this inter-relations and inferred personal and/or social and environmental factors related to the prevalence of fungals vulvovaginitis. It was collected vaginal secretions of 106 women with characteristic signals and symptoms of VVC that it was isolated on CHROMagar Candida. Colonies of *C. albicans* had been isolated, and after that, and were tested the killer activity (KA) and the sensitivity killer to VVC, in YEPD methylene blue agar. Questionnaires was applied to infer factors related to VVC. The results was submitted to statistical descriptive analyses, to qui-squares, and Fishers' tests. The significance level was determined as 5%. *Candida albicans e non-albicans* species grow in cultures of 38.68% of the woman. A sample of *C. albicans* isolated from VVC demented killer activity *in vitro* (KA) and one sample presented high KA to the Polonelli's killers yeasts. The age, personal, socio-environmental habits, were presented relation with VVC prevalence. The employed methodology, allowed to it could be concluded that that the activity to killer can manifested in physiological conditions of pH and temperature. Social and environmental factors could be related with VVC; the prevalence of species *nonalbicans* presents emergency characteristics. More studies are necessary in order to study the activity and toxicity of *in vivo* killer's toxin of *C. albicans*, that probably, they will possess activity in physiological conditions.

Key words: Vulvovaginal candidiasis; prevalence, killer's toxin, non- *albicans* *Candida* species, habits.

1 INTRODUÇÃO

Candida albicans (*C. albicans*) é um fungo leveduriforme, pertencente à microbiota do organismo humano e de mamíferos, tais como bovinos e caninos (SOUZA e SIQUEIRA, 2003; CLEFF *et al.*, 2005). Habita mucosas da orofaringe e digestiva (SIDRIM e ROCHA, 2004; BAENA-MONROY, 2005), vaginal (GIRALDO, 2000; ZHOU *et al.*, 2004; EHRSTRÖM, 2007) e mãos (BAZÁN-MORA *et al.*, 2001), podendo causar infecções, denominadas candidíases, de fontes normalmente endógenas, já que é considerado oportunista.

Dessa forma, a *C. albicans* se apresenta como importante agente de morbidade e mortalidade, sendo considerado o principal fungo patogênico humano, pois pode estar presente em mais de 50% das infecções fúngicas neste hospedeiro (RAHMAN *et al.*, 2007).

Vários fatores são relacionados com a infecção por *Candida* sp (candidíase). Fitzpatrick (1997) destaca o uso de corticosteróides tópicos ou sistêmicos, antibioticoterapia, obesidade, hiperidrose, calor, maceração, poliendocrinopatias, câncer e debilidades crônicas, além de atividades em profissões que exijam contato freqüente com água, tais como floristas, garçons, trabalhadores de saúde e domésticos.

Além disso, a imunidade local comprometida verificada em pessoas que possuem excesso de umidade em dobras ou outras áreas do corpo, nos indivíduos portadores de diabetes (LEON *et al.*, 2002) e a imunodeficiência sistêmica em portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou da síndrome da imunodeficiência humana (SIDA) constituem fatores relacionados com essas micoses (COOGAN *et al.*, 2006).

Além das condições intrínsecas do hospedeiro, existem fatores extrínsecos que se relacionam com patologias microbianas (ÁVILA-PIRES, 2000).

Assim, diante de fatores predisponentes, candidíases podem se desenvolver nas mucosas do trato vulvovaginal, sendo denominadas candidíase vulvovaginal (CVV) e apresentam espécies do gênero *Candida* como agentes etiológicos, destacando-se *C. albicans* como principal espécie envolvida (GRIGORIOU *et al.*, 2006), embora outras venham se apresentando como emergentes.

O tratamento disponível pode ser feito por via tópica e/ou sistêmica, mas nem sempre é eficiente e já existem relatos de resistência aos antifúngicos usuais (BAUTERS *et al.*, 2002).

Uma possível solução para esses problemas teve seus estudos iniciados há quase 50 anos, quando Makower e Bevan (1963) descreveram leveduras portadoras de uma característica especial denominada *killer*. Este atributo específico de algumas espécies de leveduras descobriu-se tratar de uma toxina que inibe ou mata outras leveduras da mesma, ou de outra espécie, sem afetar a linhagem portadora deste caráter.

O caráter *killer* tem sido objeto de pesquisa desde a década de 1960 (WOODS e BEVAN, 1968). Especificamente em linhagens de *C. albicans* as características *killer* vêm sendo pesquisadas por diversos autores (MERZ, 1990; MIDDELBECK *et al.*, 1980; POLONELLI *et al.*, 1983; OLIVEIRA *et al.*, 1998; BUZZINI e MARTINI, 2001) e instigam mais pesquisas com o propósito de melhor conhecer seus inúmeros aspectos, interfaces e identificar linhagens produtoras dessas toxinas. Desta forma, poderão propiciar o início do desenvolvimento de uma terapia, “alternativa” às convencionais, para tratamento e/ou controle de infecções causadas por *C. albicans*, utilizando *Candida albicans killer*.

1.1 JUSTIFICATIVA

Este estudo justifica-se ao buscar o conhecimento das interfaces dessa micose que é problema de Saúde Pública, pois atinge 75% das mulheres em idade fértil, dentre as quais 5% estão sujeitas a episódios recorrentes, gerando problemas físicos, emocionais e socioeconômicos, uma vez que envolve a auto-estima, provoca desconfortos sexuais e absenteísmo no trabalho.

Além disso, a emergência de espécies resistentes aos antifúngicos instiga pesquisas no sentido de buscar alternativas eficazes no tratamento da CVV, as quais poderiam advir da utilização de microrganismos produtores da toxina *killer*, uma vez que suas toxinas poderão ser inibidoras ou fatais para *Candida*.

1.2 HIPÓTESES

- *Candida albicans killer* inibem o desenvolvimento, ou matam *Candida albicans* patogênicas *in vitro*;
- Fatores sócio-ambientais se relacionam com a prevalência de CVV.

1.3 OBJETIVOS

Geral

- Utilizar *Candida albicans killer* para controle *in vitro* de *Candida albicans* causadoras de CVV.

Específicos

- isolar, purificar e identificar linhagens de *Candida albicans* produtoras de toxina *killer* com atividade antifúngica *in vitro* sobre *C. albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* AH 22;
- avaliar parâmetros biológicos de *C. albicans killer* frente às *C. albicans* isoladas de CVV e sobre *S.cerevisiae* AH22, verificando a inibição e/ou morte *in vitro*;
- inferir fatores pessoais e/ ou sócio-ambientais relacionados à prevalência de vulvovaginites micóticas em 2 ambulatórios públicos em Araguaína – TO.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOATIVOS NATURAIS

Diante do emprego para os mais diversos fins, bioativos naturais têm sido amplamente utilizados para o controle biológico macro e microbiano, como nos estudos sobre fitopatógenos (SANTOS e MARQUINA, 2004; MARÇAL, 2005). Isso representa um diferencial competitivo, pois, produtos livres de agrotóxicos produzidos mediante o uso de técnicas baseadas em métodos naturais, apresentam demanda crescente e aceitação no mercado consumidor.

Também nos processos de fermentação de bebidas e álcool ocorrem problemas relacionados a espécies contaminantes que diminuem a produtividade e qualidade do sistema. O controle pode ser feito mediante a utilização de microrganismos selecionados, através de um processo de competição interespecífica, utilizando linhagens portadoras do caráter *killer* na produção do álcool, tanto na prevenção da contaminação de processos etanólicos contínuos (BERTOLIN, 1995), como na seleção de linhagens para a fermentação etanólica (CECCATO-ANTONINI *et al.*, 2004).

O fenômeno *killer*, segundo Magliani *et al.*, (1997), se revela multicêntrico, envolvendo diversos profissionais desde biólogos e fitopatologistas a epidemiologistas, microbiologistas industriais, clínicos e farmacologistas.

Tal fenômeno tem gerado interesse na busca de seu significado biológico e aplicações teóricas e práticas. O estudo de opções terapêuticas usando leveduras *killer* abriu novas perspectivas para a prevenção e controle de patologias diversas.

2.2 INFECÇÕES FÚNGICAS E CANDIDÍASES

As infecções fúngicas (micoses) são um problema de saúde pública, visto que acometem grande parcela da população, de todas as classes sociais e idades, logo ao nascer, do parto à amamentação, até as mais elevadas idades. Dentre as micoses de maior ocorrência, encontram-se as candidíases, causadas por leveduras do gênero *Candida* (FITZPATRICK, 1997).

Estas doenças vêm apresentando altos índices de crescimento nas últimas décadas, sobretudo após o advento da SIDA. Estima-se que nos Estados Unidos

(EUA) as candidíases respondam pelo 4º lugar entre as infecções hospitalares, com altas taxas de morbidade e mortalidade. Nesse sentido, a busca por alternativas às terapias existentes tem sido constante, visto que são relativamente poucos os recursos terapêuticos disponíveis e a mudança da prevalência das espécies de *Candida* nas infecções, sobretudo com o crescente isolamento de espécies não albicans, tem gerado dificuldades no tratamento, pela existência de resistência inata ou dose dependente (FAN; LIU, 2007).

Várias partes do organismo humano apresentam condições que favorecem o desenvolvimento dessas patologias, em indivíduos de ambos os sexos. Diante disso, lábios, mucosa orofaríngea, unhas das mãos e pés, regiões genitais masculinas e femininas, são acometidos por doenças como gengivoestomatites, queilite angular, onicomicoses, balanopostite e vulvovaginites, respectivamente (FITZPATRICK, 1997; SIDRIM e ROCHA, 2004).

Manifestando-se em indivíduos com o sistema imunológico de alguma forma comprometido, as diversas patologias geradas por fungos podem levar ao óbito, além de os medicamentos provocarem inúmeros efeitos colaterais (BENNETT, 1996). Essas micoses geram desconforto e desdobramentos muitas vezes degenerativos e em alguns casos letais, como o alto índice de mortalidade nas candidemias observadas por Medrano e colaboradores (2006).

Uma das manifestações graves da candidíase é a forma sistêmica, candidíase sistêmica (CS), cujos agentes etiológicos são *C. albicans* e leveduras correlatas. Esta doença é caracterizada por ser infecciosa e, em alguma fase de seu desenvolvimento propagar-se a outros órgãos por via hematogênica, podendo também, ter origem exógena, com disseminação (SIDRIM e ROCHA, 2004).

Geralmente, a CS, localizada em um órgão ou disseminada, atinge pessoas com comprometimento do sistema imune e também idosos, pacientes que sofreram rupturas de barreiras mecânicas através de cateterismo, queimaduras e sondas (SIDRIM e ROCHA, 2004).

Também se encontram predispostos a essa micose, pessoas acometidas pela SIDA, enfermidade que atinge o sistema imunológico dos indivíduos, tornando-os alvos fáceis de microrganismos oportunistas, privilegiados pela eliminação de espécies competidoras, componentes da microbiota endógena. Fato que em parte se mostra devido ao desenvolvimento e emprego de antibióticos de amplo espectro,

os quais, segundo Lacaz *et al.* (2002), levam muitos indivíduos a manifestar a candidíase, especialmente por linhagens de *C. albicans*.

Tanto nas infecções hospitalares, como nas CVV, é crescente o número de espécies não *albicans*, com perfil de sensibilidade diferente de *C. albicans*, possuindo menor suscetibilidade aos antifúngicos (FIDEL JR *et al.*, 1999; RICHTER *et al.*, 2005), gerando um problema para controlar tais micoses.

Uma alternativa promissora vem da ampla biodiversidade brasileira, que sendo conhecida, poderá otimizar a utilização de bioativos microbianos para controle de infecções micóticas, incluindo as vaginais. Nesse sentido, Newman (2003), aponta a importância que produtos naturais, sobretudo de ambientes marinhos e microbianos desempenham na descoberta de novos medicamentos para tratamento de doenças humanas.

2.3 CANDIDÍASE VULVOVAGINAL

Embora candidíases possam ocorrer em ambos os sexos, as mulheres estão especialmente sujeitas a essas doenças e quando ocorre uma inflamação da mucosa vaginal causada por espécies do gênero *Candida* as mulheres encontram-se portadoras da candidíase vulvovaginal (SOBEL, 1988).

Segundo Fitzpatrick (1997), 75% delas têm pelo menos um episódio de CV (candidíase vaginal) durante a vida e 40 a 45% têm dois ou mais desses episódios, os quais, geralmente encontram-se acompanhados da forma vulvar, denominada candidíase vulvovaginal (CVV). A recorrência da patologia nas pacientes é de menos de 5%, índice aumentado em mulheres portadoras de algum tipo de comprometimento imune.

Entretanto, muito se cogita sobre as causas que levam milhares de mulheres em todo o mundo a manifestar esta patologia, e embora a maioria dos estudos existentes sejam relativamente frágeis, por trabalharem com prevalências, sabe-se que um fator certamente encontra-se associado: o hormônio feminino estrógeno, descrito tanto em estudos *in vitro* (ZHANG *et al.*, 2000) como em modelos animais (FIDEL, CUTRIGHT, STEELE, 2000; TARRY *et al.*, 2005).

Aliado a isso, alguns fatores têm sido descritos como predisponentes às CVV tais como: o alto teor de glicogênio presente nas células epiteliais da vagina, gravidez, o uso de antibióticos, contraceptivos orais, imunossupressores e tipo de

roupa íntima usada. Mensalmente, nas semanas precedentes a cada menstruação, a CVV pode manifestar-se várias vezes (SIDRIM e ROCHA, 2004), provavelmente sendo causada por *C. albicans* (_____; CALDERONI e FONZI, 2001). Quando a patologia se manifesta três ou mais vezes durante um ano, a mulher é portadora da forma recorrente da doença: candidíase vulvovaginal recorrente - CVVR (SOBEL e CHAIM, 1996).

Vários estudos têm mostrado as espécies causadoras das infecções vulvovaginais causadas por leveduras – leveduroses vulvovaginais (LVV). De fato, *C. albicans* foi a espécie de maior prevalência nessas infecções observada por Galle e Gianinni (2004), seguidas de *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*, todas, leveduras da microbiota residente dos Homens.

De forma semelhante, Ferraza e colaboradores (2005), em estudo prospectivo, encontraram maior prevalência daquela mesma espécie sobre as demais, tendo na espécie *C. glabrata* a segunda mais isolada no estado de Santa Catarina, enquanto no Paraná, a segunda espécie encontrada foi *C. guilhermondi*.

A terapêutica da CVV geralmente é feita por meio de antifúngicos tópicos e/ou sistêmicos. No caso dos sistêmicos, já existem relatos de resistência à terapia disponível tanto ao Fluconazol (FITZPATRICK, 1997), como à Anfotericina B (BENNETT, 1996), fungicidas recomendados na terapia dessa micose.

Segundo Giraldo, Gonçalves e Vicentini (2002), o uso rotineiro de antifúngicos tem induzido à diminuição de infecções causadas por *C. albicans* e *C. tropicalis*, com elevação concomitante de espécies menos sensíveis a estes fármacos como *C. krusei* e *C. glabrata*.

De fato, estudos *in vitro* de Holland e colaboradores (2003) encontraram CVV ocasionadas por espécies não *albicans*, como a levedura *C. glabrata* que se apresentava com sensibilidade dose-dependente ao medicamento Fluconazol.

2.3.1 O habitat vaginal

A vagina apresenta um ambiente que sofre transformações que acompanham a mulher em suas diversas fases da vida. Ao nascer, tanto a vulva como vagina apresentam-se influenciadas pelo estrogênio residual da mãe (FARAGE e MAIBACH, 2006). Este se relaciona com os níveis de glicogênio e ambos permanecem presentes até cerca de 6 semanas de vida, influenciando a microbiota

bacteriana adquirida no canal do parto, que nesta fase é composta basicamente por espécies de lactobacilos.

Estes microrganismos, também denominados bacilos de Döderlein, são constituídos por bactérias gram positivas, pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, estão presentes na vagina e outros habitats, metabolizam o glicogênio, produzindo ácidos orgânicos, principalmente o ácido lático, que conferem um pH caracteristicamente baixo (3,8 – 4,5) ao local (MIJAC *et al.*, 2006).

Com o declínio no nível de glicogênio residual da mãe, ocorre um aumento no pH vaginal e se observa a colonização por outros microrganismos (SIDRIM e ROCHA, 2004).

Isso demonstra a influência marcante do estrogênio na vida da mulher. Este hormônio feminino participa das principais mudanças físicas e fisiológicas ocorridas na vulva e vagina, desde o nascimento até a senilidade, interferindo no ciclo menstrual e gravidez (FARAGE e MAIBACH, 2006).

Na adolescência, ao iniciar a produção própria do estrogênio pela mulher, ocorre um aumento nos níveis de glicogênio locais, aparecendo novamente uma microbiota característica da vagina que contém os referidos bacilos de Döderlein (FARAGE e MAIBACH, 2006). Estes microrganismos provavelmente acompanharão a mulher durante toda a sua vida fértil, mantendo o pH vaginal fisiológico ácido. Após a menopausa, com a queda do nível de estrogênio, tanto a microbiota vaginal, como o pH voltam aos níveis próximos àqueles da infância (SIDRIM e ROCHA, 2004).

A vagina, durante a fase estrogênica, possui habitantes de algumas linhagens de *Lactobacillus* que formam peróxido de hidrogênio – H_2O_2 (MIJAC *et al.*, 2006), substância com atividade bactericida, que aliada à acidez do ambiente vaginal, parece criar condições inadequadas à multiplicação de microrganismos anaeróbios responsáveis por vaginite bacteriana, tais como *Gardnerella vaginalis* (AROUTCHEVA *et al.*, 2001) assim como estudos *in vitro* demonstraram atividade viricida deste composto contra HIV (KLEBANOFF e COOMBS, 1991).

No entanto, a simples presença de *Lactobacillus* sp. não garante um ecossistema vaginal saudável. Algumas linhagens não produzem H_2O_2 (KLEBANOFF e COOMBS, 1991, SCHWIERTZ *et al.*, 2006, MIJAC *et al.*, 2006) ou não formam uma biomassa necessária para garantir um pH suficientemente ácido

(AROUTCHEVA *et al.*, 2001) criando um ambiente desfavorável para a maioria das infecções vaginais bacterianas (SCHWIERTZ *et al.*, 2006).

Não obstante estarem presentes em ecossistemas vaginais saudáveis, os bacilos de Döderlein não são os únicos habitantes da mucosa vaginal. Também podem estar presentes de forma usual bactérias como *Gardnerella* sp., *Enterococcus* sp., *Peptostreptococcus* sp., *Veillonella* sp, *Atopobium* sp. (ZHOU *et al.*, 2004; SOBEL e CHAIN, 1996). ZHOU *et al.* (2004), descreveram a presença de *Megasphaera* sp. e *Leptotrichia* sp em mulheres não portadoras de CVV, espécies até então não descritas como pertencentes à microbiota residente.

Contudo, embora imprópria para a multiplicação de inúmeros patógenos bacterianos, a cavidade vaginal apresenta-se como um *microhabitat* adequado para *Candida albicans* que, acompanhadas de *Lactobacillus*, podem estar presentes no ambiente vaginal tanto em 25% das mulheres assintomáticas, como em 92% das portadoras de candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR) segundo estudos de Sobel e Chaim (1996).

Estes autores mostraram a diversidade microbiana e presença de *Lactobacillus*, que, aparentemente, não protegem a mulher de sofrer uma recorrência de candidíase vulvovaginal, conforme podem ser vistas na Tabela 1.

Diante disso pode-se questionar acerca do real significado da colonização de ambientes por esta levedura e quais os fatores envolvidos na patogenicidade, ou conceitualmente, segundo Forattini (2004), qual é a proporção de indivíduos doentes entre os infectados?

Muitos fatores estão envolvidos na resposta a esta questão. Segundo Ávila-Pires (2000), “*entre infecção e doença há a mesma relação que entre comensalismo e parasitismo*” e a transformação desta relação interespecífica comensal, para o parasitismo, isto é, da colonização para CVV, respectivamente, não depende apenas da levedura em si, mas de fatores exógenos e das condições do hospedeiro (FIDEL e SOBEL, 1996).

Estas diversas interfaces implicadas na patogenia da CVV são explicadas pelo fato de *C. albicans* não ser considerada um patógeno primário em si, pois, segundo Van Burik e Magee (2001) um microrganismo dessa natureza é caracterizado por ser capaz de infectar indivíduos saudáveis, provocando doenças sistêmicas.

Tabela 1 - Espécies isoladas na vagina de mulheres adultas saudáveis e de portadoras de CVVR agudas

Microrganismo	Saudáveis (%)	CVVR (%)
<i>Candida albicans</i>	25	92
<i>Candida parapsilosis</i>	-	8
Aeróbios ou aeróbios facultativos		
<i>Lactobacillus</i> sp.	15	29
<i>Lactobacillus salivarius</i> spp. <i>salivarius</i>)	35	37,5
<i>Lactobacillus salivarius</i> spp. <i>salicinius</i>	15	37,5
<i>Lactobacillus cateniforme</i>	15	42
<i>Lactobacillus casei</i> spp. <i>alactosus</i>	25	17
<i>Lactobacillus jensenii</i>	-	4
<i>Lactobacillus plantarum</i>	10	8
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	5	-
Total lactobacilos facultativos	90	96
<i>Streptococcus</i> sp.	15	8
<i>Staphylococcus</i> sp.	35	37,5
<i>Corynebacterium</i> sp.	25	5
<i>Micrococcus varians</i>	5	5
Cocobacilos gram variáveis	-	4
<i>Gardnerella vaginalis</i>	15	4
<i>Escherichia coli</i>	5	-
<i>Moraxella</i> sp.	-	4
Anaeróbios		-
<i>Peptococcus magnus</i>	10	4
<i>Peptococcus morbillorum</i>	5	-
<i>Lactobacillus salivarius</i> spp. <i>Salivarius</i>	-	4

Fonte: adaptado de Sobel e Chaim, 1996

Ávila-Pires (2000) considera que entre o agente infectante e o hospedeiro existem interações que dependem dos dois elementos, e, às vezes, modificações em ambos. Então, as diversas interações do Homem com a microbiota endógena que abriga e também suas relações biológicas e socioculturais com elementos da comunidade exógena e com fatores com o meio físico, são importantes ao se buscar o conhecimento da ecologia das doenças infecciosas e parasitárias (DIP).

Nesse aspecto, saúde e doença traduzem alterações qualitativas e quantitativas que ocorrem nestas micro comunidades, enquanto os determinantes

socioeconômicos, culturais ou ecológicos condicionam os fatores abióticos e microbióticos exógenos (ÁVILA-PIRES, 2000).

Uma demonstração desses fatores pode ser observada em estudo comparativo entre leveduras da microbiota oral de chineses e norte americanos, no qual prevalências de espécies de *Candida* na China apresentaram-se diversas das encontradas no ocidente. Enquanto no primeiro houve predominância de *C. albicans*, no segundo, a espécie mais prevalente foi *C. parapsilosis* (XU e MITCHEL, 2003).

No entanto, após análise mais minuciosa, ao comparar resultados encontrados no ocidente a regiões ocidentalizadas do oriente, como Hong Kong, não houve diferenças significativas entre espécies encontradas, tendo em ambos *C. albicans* como espécie mais prevalente, demonstrando a importância dos costumes na composição das espécies neste microhabitat vaginal (XU e MITCHEL, 2003).

Contudo, no interior do organismo humano, existem variações significativas entre a diversidade microbiológica em ambientes naturais harmônicos e em ambientes desequilibrados, como pode ser visto na tabela 1, referenciada por Sobel e Chaim (1996), na qual se observa que a predominância de um agente infectante provoca um desequilíbrio, oprimindo outros microrganismos presentes.

Tudo isso demonstra o papel dinâmico da candidíase vulvovaginal. Dentre as diversas interações entre os microrganismos presentes na vagina, Van Burik e Magee (2001) sugerem que possivelmente haja uma seleção de microrganismos durante a invasão ou infecção, provocando uma diferença genética da população existente entre o início e o fim do processo infeccioso.

2.3.2 Colonização vaginal e candidíase

Compondo a microbiota endógena, espécies de *Candida* podem estar presentes na vagina de 10 a 25% das mulheres assintomáticas (ECKERT *et al.*, 1998). Já nas mulheres em idade reprodutiva e sexualmente ativas e também assintomáticas, a levedura pode compor a microbiota vaginal de 13,6 a 29,4% dessas mulheres, dependendo do método de análise escolhido. Já nas portadoras assintomáticas de CVVR, a presença pode ser detectada em cerca de 30% das pacientes através da técnica de PCR. Métodos menos sensíveis identificam a presença em 22% (GIRALDO *et al.*, 2000). Dentre as mulheres grávidas e

portadoras do vírus HIV, espécies *Candida* podem ser encontradas nas culturas de cerca de 55% delas (MENDES *et al.*, 2002).

No entanto, *Candida albicans* é reconhecidamente um importante patógeno humano e sua virulência, embora ainda não completamente elucidada, encontra-se ligada à extraordinária versatilidade que permite a esta levedura sobreviver como comensal em vários sítios anatomicamente diversos e com diferentes especificidades ambientais. De fato, candidíases são infecções no corpo humano e dependem, além de fatores do hospedeiro, do agente etiológico, representado na maioria das vezes por *Candida albicans* (CALDERONI e FONZI, 2001).

Fator importante para estas patologias relaciona-se com a habilidade de mudança da morfologia de levedura para filamentosa, a qual exerce papel importante na patogenicidade. Leveduras e filamentos interagem diferentemente no sistema imune do hospedeiro e têm sido feitos estudos no sentido de elucidar quais fatores de virulência induzem à formação do filamento. Segundo Sobel (2007), a apresentação leveduriforme (blastocónidios) é responsável pela colonização assintomática e transmissão, enquanto sua germinação com produção de micélio (hifa) são comumente encontrados em vaginites sintomáticas.

Nesse sentido, durante uma infecção por *Candida*, muitos fatores de virulência podem estimular o sistema imune do hospedeiro e gerar respostas, potencialmente protetoras. Esses fatores incluem adesinas, enzimas como aspartil proteinases (Sap), fosfolipases, formação de tubo germinativo, e variabilidade fenotípica *switching* (CALDERONI e FONZI, 2001).

Ventolini *et al.*, (2006) ainda descreve como fatores de virulência da colonização vaginal por *C. albicans* a adesão às células epiteliais vaginais, presença de receptores celulares da levedura na vagina, germinação de blastosporos de *Candida*, assim como a secreção de enzimas proteolíticas, toxinas e fosfolipases.

A morfogênese, ou a capacidade de transitar entre a forma leveduriforme unicelular à formação de pseudo-hifas (cadeias ou distintas células formadas pela falha na separação da célula filha após cada divisão celular) e hifas (tubos longos e contínuos com septos separando cada núcleo, mas nenhuma reentrância distinta no local da separação) são variações que podem ser induzidas por fatores ambientais, por soro ou macrófagos (LO *et al.*, 1997).

A produção de Sap por isolados de *C. albicans*, embora citada como importante e fator possivelmente crucial na patogênese da vaginite micótica, foi

colocada em dúvida em estudos de Ozcan e colaboradores (2006) os quais mostraram que espécies não produtoras dessas enzimas, como *C. glabrata* e *C. krusei* e ainda, linhagens de *C. albicans* não produtoras dessas enzimas também podem causar vaginites, indicando que tal fator pode não ser essencial na patogênese de CVV.

Outras enzimas, como fosfolipases, também participam da patogenicidade nas candidíases conforme apontam Oliveira *et al.*, (1988) que caracterizaram amostras de *Candida albicans* isoladas da mucosa oral de pacientes com câncer, que se mostraram fortemente proteolíticas, capazes de produzir fosfolipases e são consideradas importantes na patogenicidade. Um dos genes descritos como produtor dessas enzimas, quando retirado de modelos animais demonstrou diminuir a virulência para 40% quando comparados aos animais infectados com linhagens possuidoras do gene responsável pela produção da enzima.

Quanto à defesa do hospedeiro, fatores como imunidade mediada por células (IMC) ou anticorpos têm sido inferidos como protetores de mucosas, porém estudos recentes têm contestado esse modelo, pois ensaios clínicos mostram que muitas mulheres apresentam recorrência de CVV, mesmo apresentando níveis normais de células Th1 *Candida*-específicas na circulação periférica (FIDEL JR e SOBEL, 1996).

De fato, ainda permanecem obscuros os mecanismos de defesa do hospedeiro contra CVV ou CVVR. No entanto, estudos de Barousse e colaboradores (2001) mostram evidências de que células epiteliais vaginais podem inibir o crescimento de *C. albicans* e que a redução de células epiteliais anti-*Candida* na vagina em mulheres com CVVR podem contribuir para a recorrência desta patologia.

A *Candida albicans*, se comparada com outros patógenos, possui habilidade especial de sobreviver em diferentes sítios, sob condições ambientais diversas, causando um espectro de doenças que superam outros microrganismos comensais como *Escherichia coli* (CALDERONI e FONZI, 2001).

2.3.3 Imunidade do hospedeiro

No organismo humano, leveduras como *C. albicans* convivem de forma pacífica, em condições normais, sem causar qualquer problema, nos mais variados nichos ecológicos, como trato gastrintestinal, pele e vagina. Esta relação pode se

dar por comensalismo em indivíduos saudáveis, ou parasitismo, geralmente em pessoas debilitadas ou imunocomprometidas (VAN BURIK e MAFEE, 2001).

As relações existentes como comensais em indivíduos saudáveis têm demonstrado imunidade *Candida* específica. De forma diversa, em pacientes imunocomprometidos, as infecções causadas primariamente por *Candida albicans* ocorrem freqüentemente. Mais de 90% dos indivíduos HIV+ terão um episódio de candidíase orofaríngea (COF) durante a progressão da AIDS, com possibilidade de recorrência. CVV é menos comum durante a doença HIV, indicando a diversidade e compartimentalização da resposta do hospedeiro à *Candida* (BAROUSSE *et al.*, 2005).

No entanto, há uma discordância entre o papel da imunidade mediada por células (IMC) nas mucosas vaginal e oral. Enquanto pouco ou nenhum papel na defesa local vaginal, a IMC é evidente na mucosa oral (FIDEL JR, 2002). Por outro lado, há uma forte correlação entre a redução sangüínea de células CD4+ e a incidência de candidíase orofaríngea, mas, permanece sem clareza se na sistêmica ou local a IMC é mais importante. A avaliação da IMC em estudo de Coorte em indivíduos portadores do vírus HIV+ com e sem candidíases mucosas revelaram que imunidade *Candida*-específica não difere entre HIV+ com COF ou CVV e pessoas HIV- (BAROUSSE *et al.*, 2005).

Contudo, anticorpos (Ac) *Candida*-específicos, embora presentes, são controversamente relativos quanto ao papel de proteger ou erradicar uma infecção mucosa. Enquanto estudos acerca da resistência inata da mucosa são limitados, recentemente descobriu-se que células epiteliais de lavados da saliva e vagina de indivíduos saudáveis inibem o crescimento de *Candida in vitro*. Estes dados sugerem que a imunidade à *Candida* é local, compartimentalizada e envolve mecanismos inatos sistêmicos ou de fontes locais (BAROUSSE *et al.*, 2005).

2.4 O CARÁTER *KILLER*

Em 1963, Makower e Bevan descreveram, pela primeira vez, um fenômeno em que algumas linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* possuíam a capacidade de matar outras linhagens sensíveis. Foram encontrados três fenótipos então denominados *killer*, sensíveis e neutros. Este fenômeno foi denominado "fenômeno *killer*" e as linhagens portadoras do caráter foram denominadas

“leveduras *killer*”. Outros estudos relativos a essas leveduras foram feitos tanto com *Saccharomyces* como outros gêneros, tais como *Torulopsis*, *Hansenula* e *Pichia* (PHILLISKIRK e YOUNG, 1975).

Leveduras *killer* também foram pesquisadas em processos fermentativos na busca de melhorar a produtividade e a eficiência, especialmente na fabricação de bebidas como cerveja e vinho. Bozani (1980) apud Bertolin (1995) estudando processo de fermentação alcoólica contínua, sugeriu que poderiam ser usados melhores padrões de higiene e antibióticos como a Penicilina V ácida para evitar a contaminação de fermentações alcoólicas de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias.

Embora tal recurso pudesse ser empregado, esse autor verificou ser ainda necessário utilizar algo que controlasse não somente a contaminação bacteriana em fermentações alcoólicas, mas também a invasão de leveduras selvagens provenientes da cana de açúcar utilizada na produção de etanol, como demonstrado por Bertolin (1995), que descreveu pela primeira vez o caráter *killer* nos gêneros *Dekkera* e *Schizosaccharomyces*, sendo estas, leveduras selvagens contaminantes de processos contínuos de fermentação etanólica.

Contudo, mesmo sendo objeto de interesse, o estudo do caráter *killer* apresentava dificuldades, pois não era fácil o cultivo *in vitro* de leveduras portadoras desta atividade. Diante disso, Philliskirk e Young (1975) sugeriram o cultivo em meio de cultura tamponado, tendo em vista que a variação de pH era um fator limitante do crescimento. Dessa forma, leveduras *killer* tiveram suas atividades testadas frente a linhagens de leveduras testadoras sensíveis. Posteriormente, ao aperfeiçoar a metodologia, Young e Yagy (1978) incluíram o emprego de agar para cultivo das leveduras em temperaturas de 28 a 30°C, encontrando várias linhagens portadoras do caráter *killer*.

Além dessas propriedades, a toxina *killer* vem sendo pesquisada em trabalhos diversos, sugerindo seu emprego na diferenciação de leveduras de mesma espécie (JORGE, 2000), podendo ser utilizada como marcador epidemiológico (WOODS e BEVAN, 1968; KANDEL e STERN, 1979) e biotipagem (BIRMAN *et al.*, 1997). Morace e colaboradores (1984) e Merz (1990) sugeriram o uso da toxina como marcador epidemiológico nas infecções nosocomiais de leveduras patogênicas.

Outra possível utilização da toxina *killer* foi apresentada por Kandel e Stern (1979) e Middelbeek e colaboradores (1980) que testaram sensibilidade de 239 e 142 linhagens de leveduras dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Torulopsis*, *Trichosporon* e *Rhodotorula* de origem humana frente à toxina *killer*.

Travassos *et al.*, (2004) testaram a atividade terapêutica de peptídeos sintéticos *killer* em pesquisa realizada conjuntamente por pesquisadores brasileiros e italianos demonstrando tanto *in vitro*, como *in vivo*, atividades dessas toxinas sobre o fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, abrindo novas perspectivas terapêuticas para esta micose sistêmica, prevalente na América do Sul.

Diante dos estudos acima, visualiza-se a possibilidade de desenvolvimento de formas opcionais de tratamento de micoses como candidíases, principalmente as vulvovaginais, utilizando, para tanto, toxinas de *Candida albicans killer*.

2.4.1 Ecologia do caráter *Killer*

O fenômeno *killer* em leveduras *Saccharomyces cerevisiae* foi descrito pioneiramente em 1963, como uma proteína denominada *killer*. Alguns anos após, revelou tratar-se de exotoxinas mediadas por receptores específicos na membrana de microrganismos susceptíveis (POLONELLI *et al.*, 1989). As linhagens portadoras do caráter *killer* geralmente são imunes às próprias toxinas, mas susceptíveis a toxinas secretadas por leveduras de outras espécies e gêneros.

Dentre os gêneros de leveduras, a produção de toxina *killer* já foi descrita não apenas em *Saccharomyces*, mas em *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Sporidiobolus*, *Tilletiopsis* e *Zygosaccharomyces*, conforme destacaram Marquina, Santos e Peinado, (2002), enquanto Schimitt e Breinig, (2002) observaram ainda o fenômeno em gêneros como *Ustilago*, *Williopsis*.

As leveduras portadoras de proteínas *killer* estão presentes em gêneros e habitats diversos e podem ser encontradas em um quarto das linhagens isoladas de frutas, segundo Maglianni e colaboradores (1997). Estudos brasileiros apontaram, no entanto, freqüências ainda maiores. Leveduras *killer* de habitats naturais, como frutas e outros substratos do cerrado tocantinense, encontravam-se em mais da metade das espécies isoladas (CRUZ, 2001).

De fato, a presença de leveduras *killer* nesses locais já era esperada, devido à existência de fatores considerados desejáveis para manifestação do caráter, que, segundo Maglianni e colaboradores (1997), ocorre em ambientes caracterizados por baixo pH e alta concentração de açúcar, como os descritos. Além disso, esses locais proporcionam fácil acessibilidade a potenciais vetores, como insetos, pássaros e outros animais. De fato, linhagens de leveduras *killer* em seu habitat natural possuem vantagens significativas sob leveduras sensíveis quando competem por nutrientes limitados (STARMER *et al.*, 1987).

Toxinas *killer* podem matar leveduras sensíveis através de um processo mediado por receptor, em leveduras que possuam tais receptores na parede celular e na membrana citoplasmática. A fase inicial envolve uma ligação rápida e energia-independente ao receptor primário da toxina, R1, na manoproteína ou na fração β -1,6-glucana da parede celular (BUSSEY e HUTCHINS, 1983; SCHMITT e RADLER, 1988).

Cogitou-se que a ligação da toxina com R1 pode concentrar a toxina na parede celular ou interferir no contato entre a toxina e o alvo da membrana celular. As leveduras suscetíveis podem transformar-se em resistentes às toxinas por mutações cromossômicas em um jogo dos genes que codificam as proteínas envolvidas na estrutura e no conjunto da parede celular da levedura (BONNE *et al.*, 1990).

A segunda fase, energia-dependente, envolve a translocação da toxina à membrana citoplasmática e interação com um receptor secundário da membrana, o R2. No entanto, somente o receptor para a toxina K1 da membrana foi identificado - Kre1p, uma proteína O-glicosilada da membrana celular da levedura que é inicialmente unida à membrana plasmática através da ligação glicosilfosfatidilinositol (GPI) está envolvido em ambos na biossíntese da β -1,6-glucana e conjunto receptor K1 da parede celular. Após ter alcançado a membrana plasmática, toxinas virais ionofóricas tais como K1 e zigocina (a última toxina é produzida por *Z. bailii*) rompem a função da membrana citoplasmática por formação de canais iônicos cátion-seletivos, enquanto que toxinas de K28 obstruem a síntese do DNA e mantêm células na fase S do ciclo celular, criando um broto de tamanho médio e único, de núcleo pré-replicado célula mãe (BONNE *et al.*, 1990).

Embora já tenham sido descritas atividades *killer* em leveduras do gênero *Candida*, não foram encontrados estudos que definissem claramente o mecanismo

de ação da toxina nessas leveduras. Marquina, Santos e Peinaldo (2002), em artigo de revisão descreveram que na espécie *Candida glabrata* a toxina tem natureza glicoprotéica, de base genética cromossômica e seu mecanismo de ação ocorre por meio de dano à membrana plasmática. Em *Candida albicans* não foram encontrados estudos acerca da atividade *killer*, mas sobre sensibilidade, incluindo uma das grandes utilizações dessas toxinas: a biotipagem de linhagens patogênicas (BIRMAN *et al.*, 1997; SCHIMITT e BREINIG, 2002).

3 METODOLOGIA

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho foi avaliado e aprovado pela comissão de ética em pesquisa com seres humanos da Fundação de Medicina Tropical do Tocantins, em Araguaína – TO (CEP – FMT/TO) sob número 059 (Anexo 1).

Após palestra educativa proferida por enfermeiras/os sobre prevenção de doenças sexualmente transmissíveis (DST) e sobre o exame PCCU, as pacientes foram esclarecidas sobre os objetivos da pesquisa, bem como riscos e benefícios da mesma.

As voluntárias que aceitaram fazer parte do projeto assinaram termo de consentimento livre e esclarecido, segundo normas do Comitê de Ética em Pesquisa com seres Humanos da FMT – TO.

3.2 TIPO DE ESTUDO

O estudo realizado foi do tipo transversal prospectivo, com amostra de conveniência.

3.3 LOCAL

Após solicitação inicial para realização da pesquisa junto à Secretaria Municipal de Saúde (Apêndice 1), foi concedida a autorização e feito um encaminhamento aos dois postos de saúde nos quais foram coletadas as secreções vaginais. Estes locais possuíam o serviço de coleta para o PCCU, com os maiores números de coletas diárias (Anexos 2 e 3).

3.4 SUJEITOS

3.4.1. Número de indivíduos

Participaram do estudo 106 mulheres que buscaram o serviço público para realização de exame preventivo de câncer de colo de útero (PCCU), ou para

atendimento com queixas ginecológicas, em dois postos públicos de saúde na cidade de Araguaína, Tocantins, Brasil, durante 6 meses em 2006.

3.4.2 Critérios de inclusão e exclusão

O critério de inclusão foi a existência de sinais e sintomas sugestivos de CVV tais como, vaginite com secreção branca, acompanhada de edema e/ou eritema vaginal e/ou cervical, associada ou não à forma vulvar, podendo ainda estar presentes, prurido, ardência vulvar, dispareunia e disúria externa (FITZPATRICK, 1997).

Os critérios de exclusão foram período menstrual, prática de relações sexuais nas 48 horas precedentes à coleta, uso de medicamentos tópicos vaginais nos 7 dias anteriores e presença de corrimento vaginal (leucorréia) com odor e/ou características típicas de outras afecções vaginais ou fisiológicas.

3.5 QUESTIONÁRIO

As mulheres que participaram da etapa anterior foram encaminhadas a uma sala reservada dependências dos ambulatórios e foram entrevistadas pela pesquisadora. As respostas verbais, baseadas no questionário, tiveram a finalidade de se obter informações indicativas da infecção, que poderiam ser decisivas no controle da doença e no possível uso terapêutico da toxina (Apêndice 2).

3.6 EXPERIMENTOS

3.6.1 Coletas de amostras

A pesquisa foi realizada nos dias normais de funcionamento dos postos de saúde, seguindo a rotina dos mesmos. Foram coletadas secreções vaginais das voluntárias por enfermeiros mediante o uso de dois *swabs* estéreis, um destinado à confecção de esfregaço em lâmina e outro para realização de cultura (SIDRIM E ROCHA, 2004).

3.6.2 Isolamento e identificação das leveduras

Os esfregaços foram confeccionados no próprio local da coleta, mediante a distensão das secreções na superfície de lâminas de vidro sobre uma gota de solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,85% p/v e acondicionados em recipientes plásticos e encaminhados ao laboratório, onde foram fixados em chama e corados segundo metodologia de Gram.

Na pesquisa direta em lâminas de vidro, as amostras foram visualizadas microscopicamente e consideradas positivas através da presença de blastoconídios e/ou pseudo-hifas característicos de infecções leveduriformes. Para efeito desta pesquisa a análise microscópica foi considerada apenas auxiliar e a ausência de formas leveduriformes não foi considerada prova negativa, quando a cultura em meio CHROMagar® *Candida* apresentou crescimento.

A fim de isolar as leveduras presentes nas amostras, os *swabs* coletados foram estriados em placas de Petri de vidro estéreis, tamanho 9 X12 mm, contendo 20 mL de meio de cultura CHROMagar *Candida*® (CHROMagar Microbiology, Paris, France) e incubadas a 37°C por 48 horas em câmara de incubação BOD.

Após cultivo primário, colônias consideradas *C. albicans* que apresentaram morfologia uniforme foram submetidas à purificação em placas de Petri contendo CHROMagar *Candida*® (HOUANG *et al.*, 1997) e posteriormente, transferidas para o meio YEPD para estoque e multiplicação. Quando houve crescimento de mais de uma cor ou morfologia diferentes, ambas foram purificadas. Estas amostras foram armazenadas sob refrigeração, na temperatura de 5°C.

Segundo Jabra-Rizk e colaboradores (2001) e SIDRIM e ROCHA (2004) CHROMagar® *Candida* é um meio adequado para identificação presuntiva de espécies de *Candida*. Estes últimos autores inferem que a utilização deste meio apresenta vantagens de poder diferenciar culturas simples de mistas em cultivo primário, devido à presença de mistura cromogênica.

Nesse meio de cultura é possível o crescimento de colônias com coloração verde-clara que permite a identificação presuntiva de *C.albicans* com 100% de acurária (PFALLER, HOUSTON e COFFMANN, 1996; HOUANG *et al.*, 1997).

O crescimento de outras cores e morfologias características, aliado à presença de blastoconídios e/ou pseudo-hifas na análise microscópica foi caracterizado neste estudo como leveduras não-*albicans*.

3.6.3 Teste de atividade e de sensibilidade *killer*

Para o teste de atividade *killer*, 0,25 mL de uma suspensão de cada uma das leveduras que compõem objeto deste estudo, quais sejam: *Saccharomyces cerevisiae* AH22, *C. albicans* isoladas de pacientes, leveduras *killer* padrão K1 a K9 e *Candida albicans* tipo 12 A, correspondente à escala 3 de McFarland, foram espalhadas na superfície de meio de cultura YEPD – azul de metileno - BMB (WOODS e BEVAN, 1968), previamente esterilizado e adicionado de tampão fosfato estéril, pH 4,5 (BERTOLIN, 1995), por meio de alça de Drigalski, até secagem do inóculo, para formar o tapete¹. As placas de Petri usadas, no tamanho 15 X 20 mm continham 50 mL deste meio. Sobre os tapetes foram inoculadas, através de estrias de tamanho 3 x 2 mm, utilizando palitos de madeira esterilizados, todas as espécies acima relacionadas, com exceção da levedura *Saccharomyces cerevisiae* AH22. As placas foram incubadas por 48 a 72 horas a 28°C (POLONELLI, 1983) e à 37°C (BERTOLIN, 1995).

A presença de halos transparentes e/ou azuis ao redor das estrias, representando inibição e morte, respectivamente, indica que a levedura apresenta atividade *killer* (AK) para a *S. cerevisiae* AH22 (BERTOLIN, 1995), ou para cada uma das leveduras que estejam como tapete.

Este mesmo teste serviu para verificar a sensibilidade das leveduras que compunham o tapete, às toxinas *killer* (SK). Este meio de cultura possui o indicador azul de metileno, que cora de azul as células mortas, evidenciando a atividade matadora de leveduras produtoras da toxina *killer* (BERTOLIN, 1995).

3.7 EPIDEMIOLOGIA E ESTATÍSTICA

Foram realizadas análises descritivas de atividade e sensibilidade *killer*, com aplicação do programa Excel. Os dados do questionário foram tabulados com uso do programa EPI-INFO 6.0 e as análises estatísticas foram realizadas com o programa SPSS para Windows versão 14.0. Foram construídas tabelas de frequências simples e tabelas de contingência para verificar a associação dos

¹ O tapete é obtido a partir da inoculação de 0,25 mL de uma suspensão de leveduras na superfície do meio BMB sólido com auxílio de alça de Drigalski, onde foram estriadas as amostras para os testes *killer*

diversos fatores estudados com a presença ou não de levedura. A significância das associações foi verificada com a aplicação do teste qui-quadrado e nos casos de frequências esperadas menores que 5, foi aplicado o teste de Fisher. Foi adotado o nível de significância de 5%.

3.8 PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

3.8.1 CHROMagar® Candida (HOUANG *et al.*, 1997)

Peptona.....	2 g
Glicose	20 g
Cloranfenicol	0,5 g
Agar.....	15 g
Mistura cromogênica	2 g
Água esterilizada.....	1000 mL

3.8.2 Meio YEPD

Extrato de levedura	1%
Peptona.....	2%
Glicose	2%
Agar.....	2%
Água destilada qsp	1000 mL

3.8.3 Meio YEPD - azul de metileno tamponado - BMB

Extrato de levedura	1%
Peptona.....	2%
Glicose	2%
Agar.....	2%
Azul de metileno	0,003%
Tampão citrato-fosfato	100 mL
Água destilada qsp	1000 MI

3.8.4 Tampão Citrato-Fosfato

Solução A

Ácido cítrico.....	19,21g
Água destilada qsp	100 mL

Solução B

K ₂ HPO ₄ (fosfato bibásico de potássio).....	34,84g
Água destilada qsp	100 mL

Adiciona-se à solução A, partes da solução B em potenciômetro, sob agitação, até ajustar o pH em 4,5.

3.8.5 Solução de azul de metileno

Preparo de Solução Estoque a 6% p/v (BERTOLIN, 1995)

Azul de Metileno.....	6 g
Água destilada qsp	100 mL

Utilizam-se 0,5 mL da solução estoque para o preparo de 100 mL de Meio BMB.

3.8.6 Solução de Cloreto de Sódio 0,85% p/v

Cloreto de Sódio PA.....	0,85 g
Água destilada qsp	100 mL

3.8.7 Esterilização

Os meios de Cultura e reagentes, com exceção de CHROMagar®, as demais soluções, vidrarias e materiais utilizados foram esterilizados em autoclave vertical a 121 ° C, sob pressão, durante 20 minutos.

3.9 CONTROLES

A cada preparo do meio CHROMagar, utilizado para identificação das leveduras, a linhagem *Candida albicans* tipo 12 A foi semeada, a fim de testar o meio e para o teste de atividade *killer*, foram semeadas linhagens reconhecidamente *killer* junto com amostras, em distribuição aleatória.

3.9.1 Leveduras padrão

As leveduras utilizadas como linhagens padrão foram: *Candida albicans* tipo 12 A e leveduras *killer* padrão K1 a K9, correspondendo respectivamente à *Hansenula sp* (Stumm-1034), *Pichia sp* (Stumm-1035), *Hansenula anomala* (Um-Milano), *Hansenula anômala* (CBS-5759), *Hansenula anomala* (Ahearn-UN866), *Hansenula californica* (Ahearn-WC40), *Hansenula canadensis* (Ahearn-WC41), *Hansenula dimennae* (Ahearn-WC44), *Hansenula mrakii* (Ahearn-WC51). Estas nove linhagens padrão foram cedidas pelo Laboratório de Leveduras Patogênicas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP). A linhagem testadora de sensibilidade *Saccharomyces cerevisiae* AH22 pertence à coleção do Laboratório de Microbiologia e Saúde Pública da Universidade Federal do Tocantins (Tabela 2).

Tabela 2 – Leveduras padrão utilizadas nos experimentos

Amostra Padrão	Espécie / Linhagem	Denominação Utilizada
K1	<i>Hansenula sp</i> (Stumm-1034)	L22
K2	<i>Pichia sp</i> (Stumm-1035),	L3
K3	<i>Hansenula anomala</i> (Um-Milano)	L18
K4	<i>Hansenula anomala</i> (CBS-5759)	L27
K5	<i>Hansenula anomala</i> (Ahearn-UN866),	L13
K6	<i>Hansenula californica</i> (Ahearn-WC40)	L31
K7	<i>Hansenula canadensis</i> (Ahearn-WC41)	L35
K8	<i>Hansenula dimennae</i> (Ahearn-WC44)	L8
K9	<i>Hansenula mrakii</i> (Ahearn-WC51)	L40
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AH22	AH22
<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i> 12 A	L1

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PREVALÊNCIA DE VULVOVAGINITES POR LEVEDURAS

As culturas obtidas das secreções vaginais das 106 voluntárias portadoras de vulvovaginite(VV) que apresentavam sinais e sintomas sugestivos de candidíase, revelaram que uma ou mais leveduras eram agentes etiológicos em 41 mulheres, enquanto que em 65 não eram esses os agentes da patologia, representando uma prevalência de 38,68% e 61,32%, respectivamente (Figura 1).

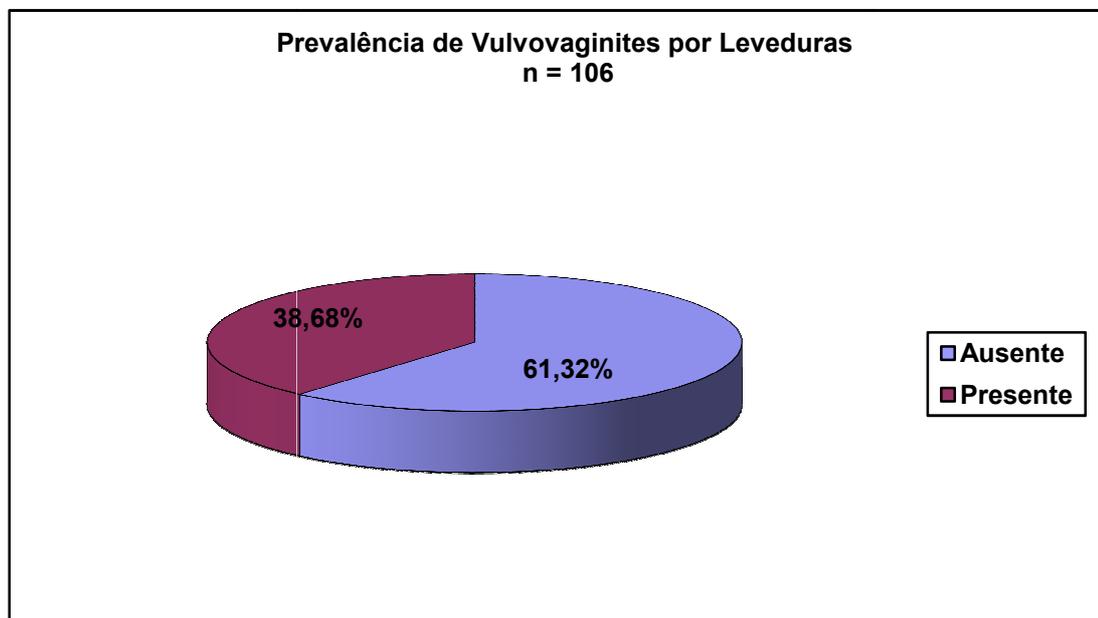


Figura 1- Prevalência de Vulvovaginites por Leveduras

4.1.2 Leveduras isoladas de vulvovaginites em CHROmagar® Candida

Neste estudo foram encontradas 46 leveduras nas culturas de 41 mulheres aqui denominadas genericamente como portadoras de leveduroses vulvovaginais. *C. albicans* foram identificadas como agente etiológico em 31 voluntárias (67, 39%) e outras espécies diferentes espécies de leveduras cresceram na cultura de 15 mulheres (32,61%).

O número de espécies não-*albicans* isoladas das pacientes sintomáticas apresentou uma frequência de quase 50% em relação às *C. albicans* (Tabela 3).

Tabela 3 – Frequência e espécies de Leveduras Isoladas de Vulvovaginites

Leveduras Isoladas de Vulvovaginites em Ambulatórios Públicos		
Leveduras	Frequência	Percentual
<i>Candida albicans</i>	31	67,39
Leveduras não <i>C. albicans</i>	15	32,61
Total (n)	46	100,00

Estes dados encontram-se como descrito na literatura, que aponta o crescimento de espécies não-*albicans* em candidíases vulvovaginais (FIDEL, VAZQUESZ e SOBEL, 1999; ECKERT, 2006), porém são superiores aos apresentados por Moreira e Paula (2005) cujas prevalências em mulheres com sinais e sintomas de CVV foram de 90% de *C. albicans*, seguidas de outras espécies não- *albicans*.

Ainda com relação às espécies não-*albicans*, Sobel (2007), revisando estudos de CVV, aponta que a prevalência destas espécies principalmente *C. glabrata*, pode ser encontrada em 10 a 20% das mulheres portadoras dessa patologia.

A identificação de infecções simples e mistas foi possível devido ao cultivo primário ter sido realizado em CHROMagar® Candida. No primeiro caso, encontrou-se cor verde-clara, caracterizando *C. albicans* que pode ser vista na Figura 2.



Figura 2 - Isolamento primário de *C. albicans* em CHROMagar® Candida. Cultivo por 48 h a 37°C

Nas culturas onde houve o crescimento de colônias verdes junto com outras cores, como a cor arroxeadada, mostrada na Figura 3, foram identificadas como infecções mistas.

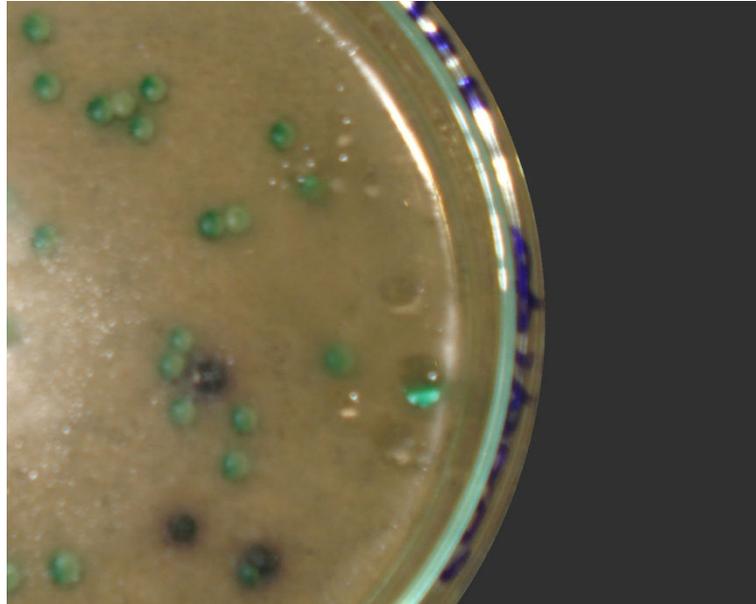


Figura 3 – Isolamento primário apresentando cultura mista contendo *Candida albicans* (verde) e levedura não-*albicans* (arroxeadada) em meio CHROMagar® Candida

Além de cultura mista, contendo espécies *albicans* associadas a espécies não-*albicans*, ocorreram vulvovaginites causadas apenas por espécies não-*albicans*, conforme mostrados nas Figuras 4 e 5.

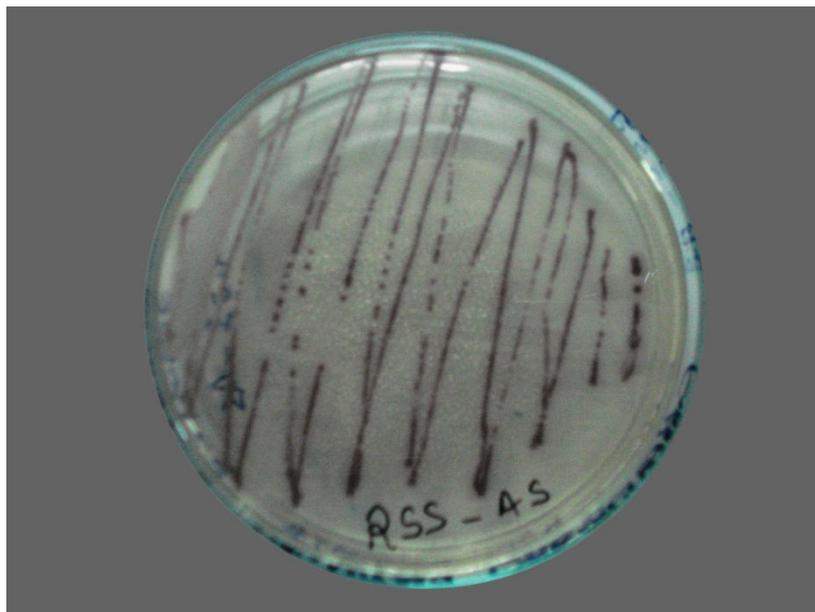


Figura 4 – Levedura não-*albicans* em CHROMagar® Candida



Figura 5 – Levedura não-*albicans* em CHROMagar Candida

4.2 INFECÇÃO MISTA

Nota-se que o número de leveduras isoladas foi superior ao número de mulheres que apresentaram cultura positiva, pois em algumas amostras, mais de uma levedura foi isolada da mesma paciente.

No universo de 41 mulheres que apresentaram resultado positivo, foram isoladas 46 leveduras, houve maior proporção de *C. albicans*: 75,61% (31/41), em relação a espécies não *albicans* 36,58% (15/41). O somatório não perfaz 100% porque em culturas de algumas mulheres houve crescimento de mais de uma espécie ou linhagem.

Os resultados mostraram infecção mista por duas linhagens de *C. albicans*. Este fato, já foi descrito anteriormente em 1983 por Polonelli e colaboradores, onde a prevalência de leveduras em infecções mistas intraespecíficas encontrada envolveu a espécie *C. albicans* em dois diferentes sítios no mesmo hospedeiro.

Neste estudo, os dados mostram pacientes que apresentaram isolamento de mais de uma espécie ou linhagem representaram 12,20% (5/41) das vulvovaginites por leveduras, sendo que na cultura de uma voluntária foram isoladas 2 linhagens de *C. albicans*. O crescimento de apenas uma espécie foi 87,80% (36/41) das quais *C. albicans* representou 60,98% (25/41).

A freqüência e leveduras isoladas de vulvovaginites com infecção simples e mista podem ser vistas na Tabela 4.

Tabela 4 - Leveduras Isoladas em mulheres portadoras de sinais e sintomas de candidíase vulvovaginal durante 6 meses em 2006

Freqüência de Isolamento e Espécies de Leveduras em Mulheres com Sinais e Sintomas de CVV		
Espécies Isoladas	Freqüência (mulheres)	Nº Leveduras Isoladas
<i>C. albicans</i> *	25	25
<i>C. albicans</i> e <i>C. albicans</i> **	1	2
<i>C. albicans</i> e leveduras não <i>albicans</i> **	4	8
Leveduras não <i>albicans</i> *	11	11
Amostras positivas	41	46
Amostras negativas	65	0
Total	106	46

*cultura simples; ** culturas mistas

O agente etiológico de CVV nos postos de saúde estudados em Araguaína acompanha o perfil de emergência de espécies não *albicans* em vulvovaginites micóticas, como descrito na literatura, que apresenta números crescentes de infecções por espécies não *albicans* (FIDEL JR, VAZQUESZ e SOBEL, 1999; NETO, HAMDAN e SOUZA, 1999; ECKERT, 2006).

Porém, estes dados são superiores aos encontrados por Paula e Moreira (2005) onde a prevalência em mulheres com sinais e sintomas de CVV apresentou 90% da espécie *C. albicans*, seguidas de outras espécies não *albicans*, enquanto Sobel (2007), revisando estudos de CVV, aponta que a prevalência destas últimas, especialmente, *C. glabrata* é de 10 a 20% das mulheres portadoras dessa patologia.

Por outro lado, Sant'ana e colaboradores (2002) descreveram 12 casos de infecção mista (9%) por *C. albicans* na mucosa oral de pacientes portadores de SIDA, dentre os quais 3 eram por 2 sorotipos diferentes desta espécie.

4.2.1 Infecção mista e atividade *killer*

Na infecção mista intraespecífica descrita nesse estudo, os aspectos macroscópicos de ambos isolados apresentaram diferenças fenotípicas sugestivas de presença de mais de uma linhagem. Estas espécies foram denominadas L7 e

L11 e analisadas quanto à atividade (AK) e sensibilidade *killer* (SK) nas temperaturas de 28 e 37°C a fim de verificar se havia uma heterogeneidade de comportamento, o que auxiliaria a caracterizar a presença de diferentes linhagens. Os resultados são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Atividade (AK) e sensibilidade *killer* (SK) de 2 leveduras em temperaturas de 28 e 37°C

Levedura	Temperatura			
	28°C		37°C	
	AK	Sensibilidade	AK	Sensibilidade
L11	34	5	27	1
L7	16	8	13	7

Diante dos resultados pôde-se verificar que houve diferenças entre (SK) e (AK) dessas leveduras frente às leveduras *killer*, tanto dos isolados deste estudo, como das testadoras. Desta forma, diante comportamento diferenciado frente às leveduras *killer*, provavelmente, se tratam de espécies de cepas diferentes, pois a sensibilidade a essas toxinas permite diferenciar linhagens, fator importante em estudos epidemiológicos, sobretudo na biotipagem de leveduras e fungos patogênicos (SCHIMITT e BREINIG, 2002).

Diante disso, para analisar a possibilidade de uma levedura isolada de uma infecção mista possuir atividade *killer* diferenciada, dividiu-se um grupo de 30 mulheres portadoras de CVV por *C. albicans* entre aquelas infectadas com um único tipo de levedura (25 mulheres) e as com mais de um tipo de levedura (5 mulheres).

A Tabela 6 mostra a AK média das leveduras oriundas de infecção simples foi de 5,84 e o desvio padrão de 2,48. Isso significa que, em média, as leveduras das mulheres uni-infectadas mataram aproximadamente outras 6 leveduras. A AK média das leveduras presentes em infecção mista foi de 15, e o desvio padrão de 7,84. Ou seja, a AK média destas leveduras foi muito superior à das uni-infectadas.

Tabela 6 – Tipo de Infecção, Leveduras Isoladas e Atividade *Killer* de CVV

Infecção	Tipo de Leveduras Isoladas (n=30)	n	AK Média	Desvio Padrão
Infecção simples	<i>C. albicans</i> (n = 25)	25	5,84	2,48
Infecção mista	<i>C. albicans</i> + espécies não <i>albicans</i> (n =4)	5	15	7,86
	<i>C. albicans</i> + <i>C. albicans</i> (n=1)			

Sob a condição hipotética de que essa seria uma amostra aleatória, aplicou-se o teste t para verificar se a diferença entre as médias é estatisticamente significativa. Para tanto, verificou-se inicialmente se as variâncias dos dois grupos (infecção simples e infecção mista) poderiam ser consideradas estatisticamente iguais ou diferentes, por meio do teste de Levene.

Os resultados indicaram que as variâncias dos dois grupos deveriam ser assumidas como diferentes. O teste t correspondente apontou um p -valor de 0,058, sugerindo que há uma tendência de que a AK média das leveduras de infecção mista seja superior àquelas em infecção simples.

Nesse sentido, autores apontam que o caráter *killer* pode representar uma vantagem competitiva nos ambientes nas linhagens que o possuem, talvez por isto, as linhagens presentes em infecção mista tenham apresentado maior atividade *killer*.

4.2 FATORES PESSOAIS E SÓCIO-AMBIENTAIS RELACIONADOS ÀS LEVEDUROSES VULVOVAGINAIS

Os resultados deste estudo mostram freqüência maior de leveduroses em mulheres com idade abaixo de 40 anos, fato que reforça a influência do hormônio feminino na prevalência da doença (p valor 0,024). De forma análoga, Clemons e colaboradores (2004) demonstraram que a indução de CVV em ratos depende da aplicação desses hormônios e Tarry e colaboradores (2005), demonstraram a presença de um alvo protéico de alta afinidade para estrógenos em *C. albicans*.

As relações entre essa patologia e o ciclo hormonal foram evidenciadas por Rosa e Rumel (2004), em pesquisa demonstrando que ciclos menstruais regulares constituem fatores de risco para CVV.

Dentre os vários fatores descritos como predisponentes às LVV, verificou-se que o uso de calça jeans (p valor 0,014) e uso de saia menos de 1 vez por semana (p valor 0,005) foram associados às LVV. Por outro lado, o hábito de secar calcinhas ao sol (p valor 0,067) seguido pela maioria absoluta das mulheres, mostrou, tendência a desempenhar papel protetor, considerando um nível de significância de 5%, ao passo que o hábito de usar ferro elétrico para secar calcinhas indicou estar associado à LVV (p valor 0,043). Quanto aos hábitos sexuais, as mulheres que declararam praticar sexo anal apresentaram maior freqüência de vulvovaginites micóticas (p valor 0,029), assim como estudos de Bradshaw *et al.*, (2005).

Outros aspectos como número de relações sexuais, uso de anticoncepcionais hormonais orais, não mostraram valores significativos, assim como encontrados por Rylander, Berglund e Petrini, (2004) em estudo sobre prevalência de CVV em jovens sexualmente ativas na Suécia. A Tabela 7 apresenta alguns fatores relacionados à presença de LVV encontrados.

Tabela 7 - Fatores Relacionados à Presença de Leveduras Vulvovaginais em Pacientes Sintomáticas

Freqüência de leveduras presentes e ausentes por fator e respectivos valores de <i>p</i>						
Fator	Ausente		Presente		Valor de <i>p</i>	
	Freqüência	Porcentagem	Freqüência	Porcentagem		
Presença de Coceira						
Não	51	67,11	25	32,89	0,052	
Sim	14	46,67	16	53,33		
Uso de saia						
1 vez ou mais	64	65,31	34	34,69	0,005	
Menos de uma vez	1	12,50	7	87,50		
Uso de Jeans						
Não	56	67,47	27	32,53	0,014	
Sim	9	39,13	14	60,87		
Número de banhos diários						
Máximo de 2 banhos	18	75,00	6	25,00	0,118	
3 banhos ou mais	47	57,32	35	42,68		
Seca calcinha no Sol						
Não	5	38,46	8	61,54	0,067	
Sim	59	64,84	32	35,16		
Uso de ferro para secar calcinha						
Não	62	64,58	34	35,42	0,043	
Sim	3	30,00	7	70,00		
Sexo Anal						
Não	62	64,58	34	35,42	0,029	
Sim	1	16,67	5	83,33		
Faixa etária						
Até 40 anos	54	58,06	39	41,94	0,024	
41 anos ou mais	11	91,67	1	8,33		

* Os valores de *p* em negrito foram determinados pelo Teste Exato de Fisher, os demais pelo Qui-quadrado

A prática de uso de medicamentos adquiridos sem receita foi observada neste trabalho, mas não apresentou resultados significativos. O uso de plantas medicinais também foi verificado em mulheres com LVV, porém após análise estatística não apresentou significância.

4.3.1 Idade, renda e moradia

A idade das 105 voluntárias que responderam ao questionário ficou compreendida entre 16 e 63 anos, apresentando média de 29 anos. Mulheres que se declararam casadas foram 78%, enquanto 25% solteiras e 1% separadas.

Quanto à moradia, 80% moram em casa própria ou da família, 96% têm água fornecida pela companhia de saneamento - Saneatins e 2% usam somente água de poço. O número de moradores por residência encontra-se na Tabela 8.

Tabela 8 – Número de Moradores por Residência em famílias de Mulheres Participantes da Pesquisa Sobre CVV em Postos de Saúde de Araguaína – TO

Moradores	Freqüência	Porcentagem
1	2	1,89
2 a 4	60	56,60
5 a 8	38	35,85
Mais de 8	2	1,89
NR	4	3,77
Total	106	100,00

A renda familiar das mulheres participantes da pesquisa foi agrupada por classes, com respectivas freqüências. A maior parte foi encontrada em famílias cuja renda média situou-se entre 1 e 3 salários mínimos, conforme Tabela 9. Não houve associação entre renda e LVV.

Tabela 9 – Renda Familiar de Mulheres Suspeitas de Portar CVV Atendidas em Postos de Saúde de Araguaína – TO

Renda Familiar	Frequência	Porcentagem
Menos de 1 SM	7	6,60
De 1 a 3 SM	72	67,92
De 3 a 5 SM	14	13,21
De 5 a 10 SM	4	3,77
NR	9	8,49
Total	106	100,00

4.4 ATIVIDADE *KILLER* (AK) E SENSIBILIDADE *KILLER* (SK)

Os testes de AK e SK feitos em meio YEPD azul de metileno tamponado (BMB) são mostrados abaixo. Os halos transparentes existentes ao redor das estrias na Figura 6 representam inibição do crescimento das amostras contidas no tapete e os halos azuis, morte celular. Neste caso, exercida por leveduras testadoras *killer*.

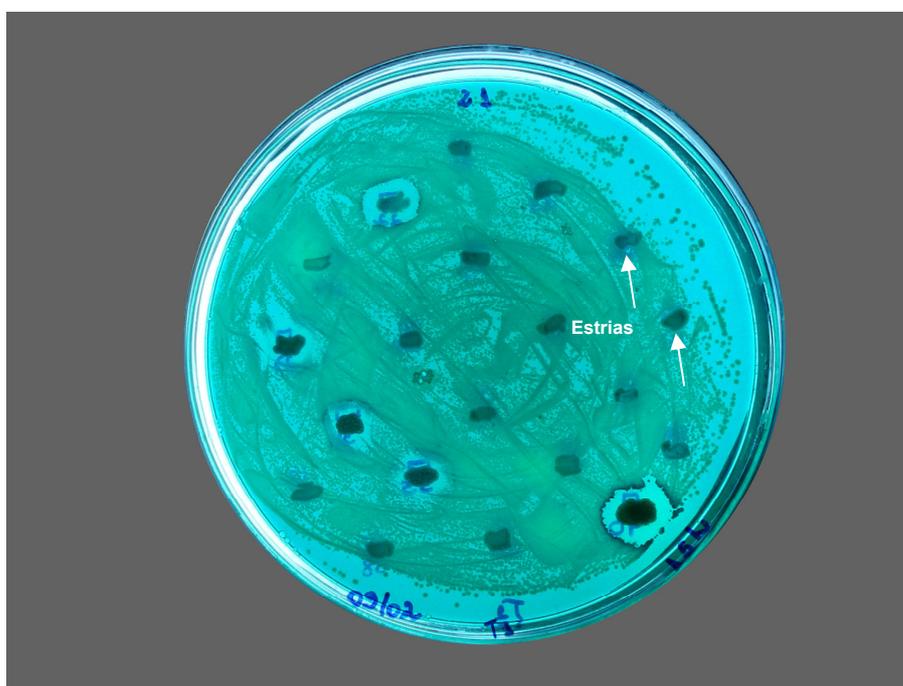


Figura 6 – Cultivo de leveduras em meio BMB para testes de AK e SK. Esta placa contém halos de inibição (transparentes) e morte (azuis) que nesta placa margeiam estrias de leveduras *killer* de Polonelli

A Figura 7 contém as amostras estriadas com números 11 e 14 que apresentaram AK e são linhagens de *C. albicans* isoladas de CVV nesta pesquisa. O diâmetro do halo da amostra L11 é maior que o das amostras testadoras e deriva de paciente com infecção mista por 2 linhagens de *C. albicans*.



Figura 7 – Cultivo de leveduras em meio BMB para testes de AK e SK. Estrias de número 8 e 13 são testadoras *killer* Polonelli, enquanto as de número 11 e 14 são amostras de pacientes.

Os resultados de atividade e sensibilidade *killer* nas temperaturas de 28°C e 37°C após cultivo por 48 a 72 horas são mostrados na Tabela 10, onde se pode verificar que a amostra (L11) possui a melhor atividade *killer*, em ambas as temperaturas.

Tabela 10 - Frequência de atividade (AK) e sensibilidade *killer* (SK) de leveduras nas temperaturas de 28°C e 37°C em meio BMB

Ordem	AK* 28° C		SK** 28° C		AK* 37°C		SK** 37° C	
	Levedura	Frequência	Levedura	Frequência	Levedura	Frequência	Levedura	Frequência
1°	L11	34	L13	3	L11	27	L3	0
2°	L40	33	L40	4	L3	19	L8	0
3°	L22	29	L11	5	L25	18	L13	0
4°	L13	28	L38	5	L35	15	L18	0
5°	L18	28	L3	6	L1	14	L22	0
6°	L8	27	L7	8	L7	13	L27	0
7°	L35	26	L39	8	L8	13	L31	0
8°	L27	25	L1	9	L13	13	L35	0
9°	L31	22	L9	9	L39	12	L40	0
10°	L1	20	L20	9	L18	10	L11	1
11°	L25	19	L37	9	L22	10	L21	1
12°	L3	18	L2	10	L24	10	L6	4
13°	L7	16	L10	10	L31	10	L10	4
14°	L5	12	L18	10	L40	10	L33	5
15°	L33	12	L21	10	L5	9	L34	5
16°	L24	11	L29	10	L6	9	L38	6
17°	L36	11	L31	10	L27	9	L7	7
18°	L16	10	L33	10	L38	9	L9	7
19°	L19	10	L34	10	L10	8	L23	7
20°	L9	9	L35	10	L14	8	L1	8
21°	L14	9	L4	11	L28	8	L17	8
22°	L15	9	L8	11	L2	7	L24	8
23°	L32	9	L6	12	L15	7	L30	8
24°	L39	9	L23	12	L32	7	L32	8
25°	L2	8	L28	12	L17	6	L15	10
26°	L12	8	L30	12	L29	6	L25	10
27°	L20	7	L32	12	L36	6	L39	10
28°	L38	7	L17	14	L12	5	L5	12
29°	L6	6	L22	14	L21	5	L12	12
30°	L17	6	L16	15	L26	5	L14	12
31°	L29	6	L24	15	L34	5	AH22	13
32°	L10	5	AH22	15	L9	4	L29	14
33°	L23	5	L15	16	L16	4	L2	15
34°	L26	5	L36	16	L19	4	L19	15
35°	L34	5	L27	18	L23	4	L28	15
36°	L37	5	L5	20	L33	4	L37	15
37°	L4	4	L25	20	L37	4	L4	17
38°	L28	4	L12	21	L4	3	L26	18
39°	L30	3	L19	21	L30	3	L16	19
40°	L21	0	L26	23	L20	1	L36	23
41°	-	-	L14	28	-	-	L20	27

*AK dados crescentes e **SK decrescentes

4.4.1 Atividade *killer* e temperatura

Neste experimento verificou-se que a atividade *killer* das leveduras testadas diminuiu com aumento de temperatura, porém, as testadoras de Polonelli K1 a K9 diminuíram atividade de forma mais acentuada do que amostras de *C. albicans*. Halos de inibição são mostrados nas figuras 8 e 9.

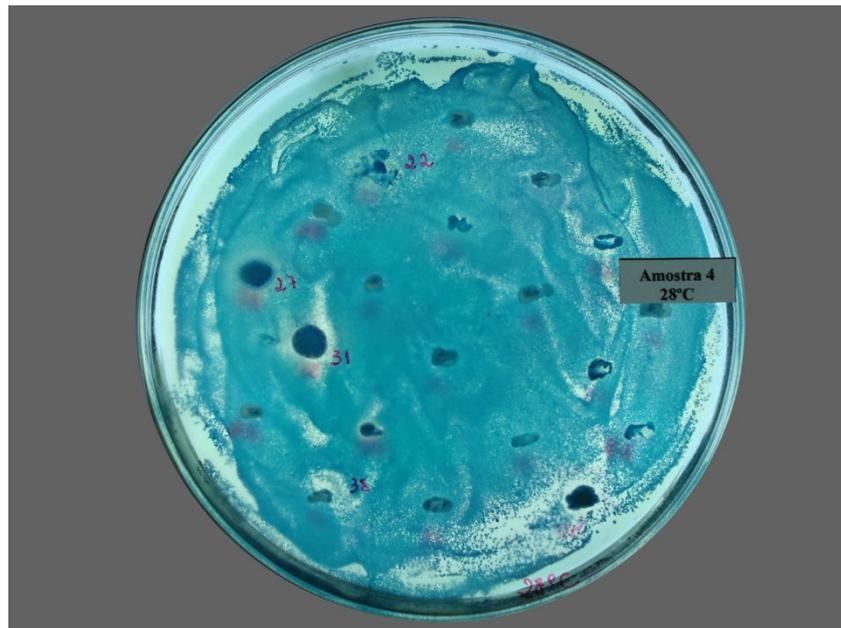


Figura 8 – Amostra em meio BMB apresentando halos de inibição (HI) e morte (HM)

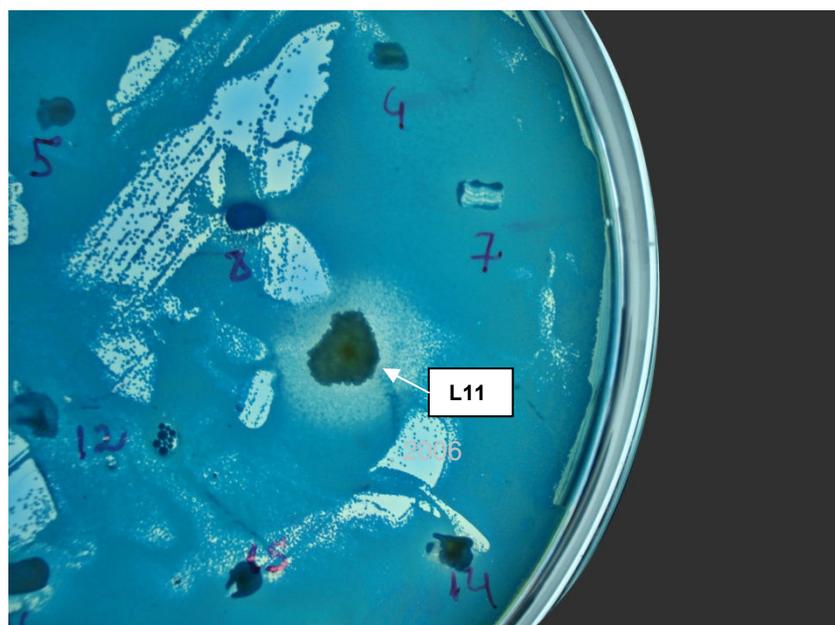


Figura 9 - Amostra em meio BMB apresentando halos de inibição evidente em L11

A amostra L11 encontra-se nos gráficos de dispersão entre aquelas que apresentaram melhor AK e menor SK, com padrão comparável às testadoras K1 a K9 na temperatura ideal de cultivo dos padrões *killer*, ou seja, a 28°C e também à 37°C (Gráficos 1 e 2).

Gráfico 1 – Frequência de atividade (AK) e sensibilidade *killer* (SK) de leveduras à 28°C

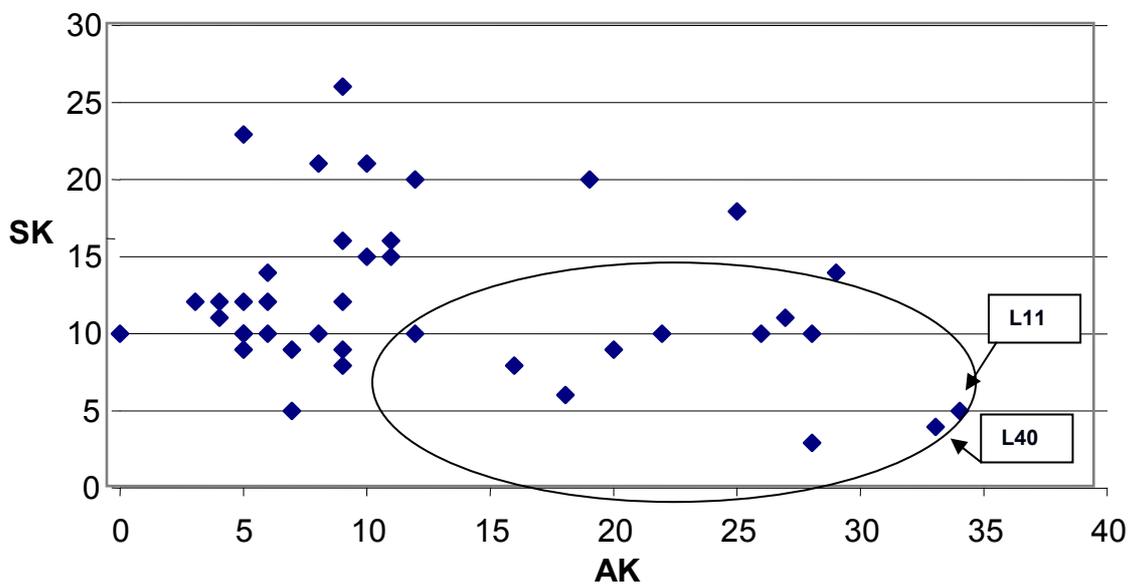
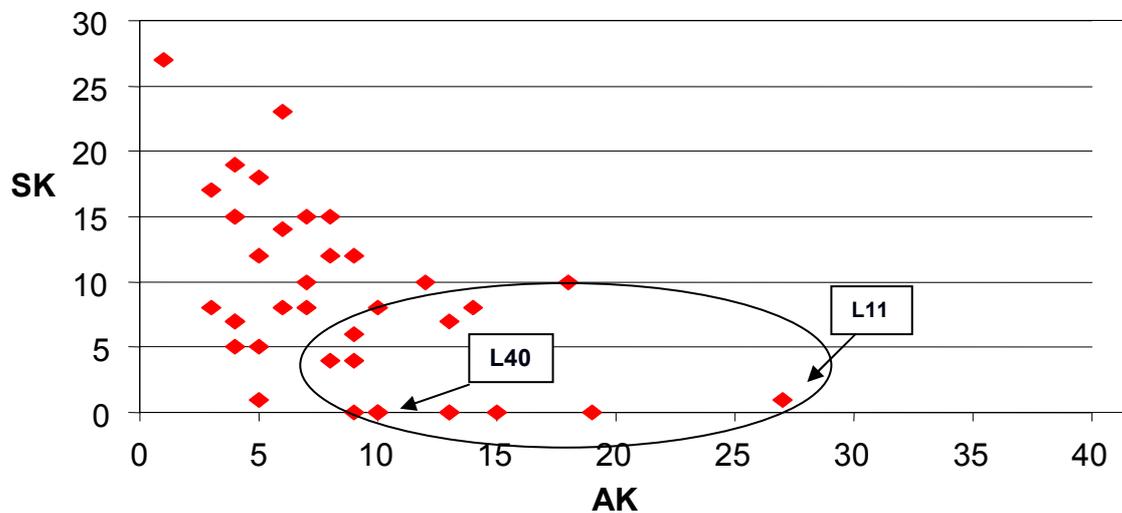


Gráfico 2 - Frequência de Atividade (AK) e de Sensibilidade *Killer* (SK) de leveduras a 37°C



Verificou-se que na temperatura de 37°C houve um deslocamento geral para a esquerda que representou uma diminuição na AK. No entanto, as leveduras *killer*, tais como a L40 (testadora *killer* de Polonelli) apresentaram uma queda mais acentuada na atividade ao serem comparadas com a amostra L11, que apresentou melhor atividade dentre todas em ambas as temperaturas.

As leveduras *killer*, conforme mostrado na Figura 10, não cresceram na temperatura de 37°C, conforme a amostra L18. Pode-se observar a ausência de crescimento do tapete, e não foi possível determinar sensibilidade neste caso.

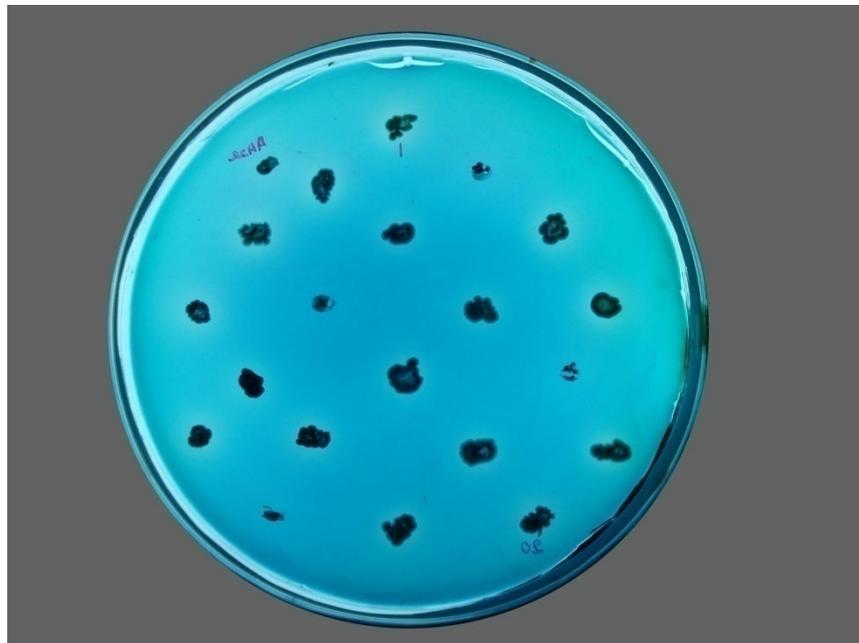


Figura 10 - Amostra L18 cultivada a 37°C

A figura 11 apresenta AK de *C. albicans* tipo 12 A. Nesta imagem podem ser visualizados os halos transparentes representando inibição, no interior de halos azuis de morte.

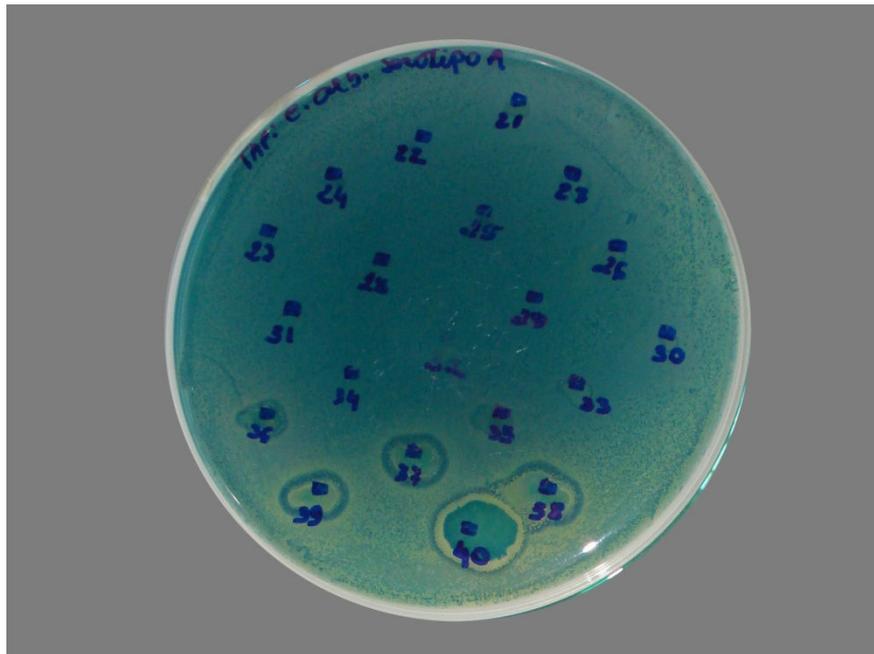


Figura 11 - Atividade *killer* apresentada pela amostra *C. albicans* 12 A. Esta figura mostra halos de morte nítidos.

A Figura 12 apresenta a diferença de atividade de leveduras presentes em infecção mista (L7, L11, L25) comparadas com *C. albicans* tipo 12 A (L1) e duas leveduras *killer* (L8 e L40) que apresentaram AK elevada a 28°C. Observa-se que a atividade diminui com o aumento da temperatura. No entanto, a AK das testadoras de Polonelli (L8 e L40) caiu de forma muito mais acentuada do que as demais amostras.

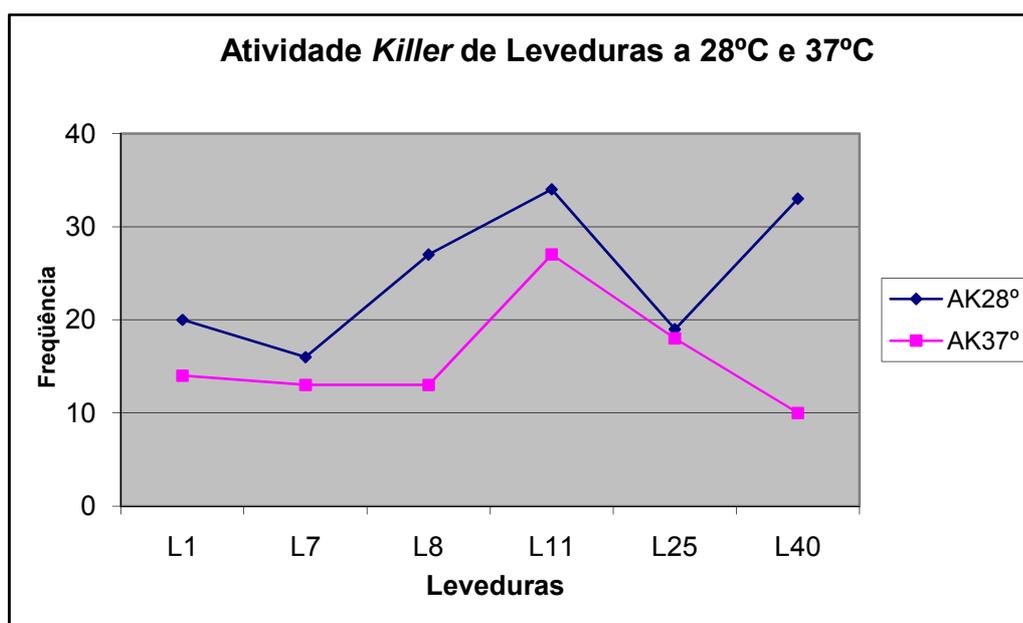


Figura 12 - Atividade *killer* de leveduras isoladas de infecções mistas comparadas com *C. albicans* tipo 12 A e *killers* a 28 e 37°C

A tabela 11 mostra a posição de leveduras selecionadas por possuir melhor atividade , associadas a menor sensibilidade neste estudo em termos de atividade *killer* (AK) nas temperaturas de 28°C e 37°C.

Tabela 11 - Atividade *Killer* (AK) de leveduras selecionadas em 2 temperaturas

Atividade <i>Killer</i> (AK) de Leveduras em 2 Temperaturas		
Ordem	AK 28°C Levedura	AK 37°C Levedura
1º	L11	L11
2º	L40	L3
3º	L22	L25
4º	L13	L35
5º	L18	L1
6º	L8	L7
7º	L35	L8
8º	L27	L13
9º	L31	L39
10º	L1	L18
11º	L25	L22

Observa-se que a 28°C, das 11 leveduras que apresentaram maior AK, 8 são representadas por amostras *killers* testadoras de Polonelli, 3 por *C. albicans*, sendo 2 obtidas de pacientes e 1 de coleção do ICB - USP.

No entanto, a 37°C observa-se melhora de desempenho de espécies *C. albicans*, que ocupam nesta temperatura 5 das 11 primeiras em atividade e ocorre conseqüente piora das *killers* de Polonelli. Além da L11, que foi a que apresentou melhor desempenho em ambas as condições de temperatura, a L25, passou a ocupar a terceira posição; a L1, L7 e a L39 as posições 5, 8 e 9, respectivamente, ocupando posições de leveduras já reconhecidamente portadoras do caráter *killer*.

4.4.2 Sensibilidade *killer* da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Os experimentos puderam demonstrar, sobretudo nas testadoras K1 a K9, que a sensibilidade aumenta na medida em que diminui a atividade das toxinas. As análises realizadas com as *killers* mostraram baixa sensibilidade a 28 °C e alta atividade, ao contrário, quando estas leveduras foram cultivadas como tapetes à

37°C, não houve crescimento dos tapetes e, portanto, não se pode falar em sensibilidade à 37°C. Os testes também mostraram uma diminuição na atividade de forma acentuada, fato referenciado pela literatura, que mostra diminuição da atividade nestas temperaturas. (POLONELLI, *et al.*, 1983)

As leveduras *killer* não cresceram em meio BMB a 37°C (figura 12) e a levedura AH22, apresentou um crescimento lento, ao ser comparada com temperatura de 28°C, conforme mostra a figura 13.

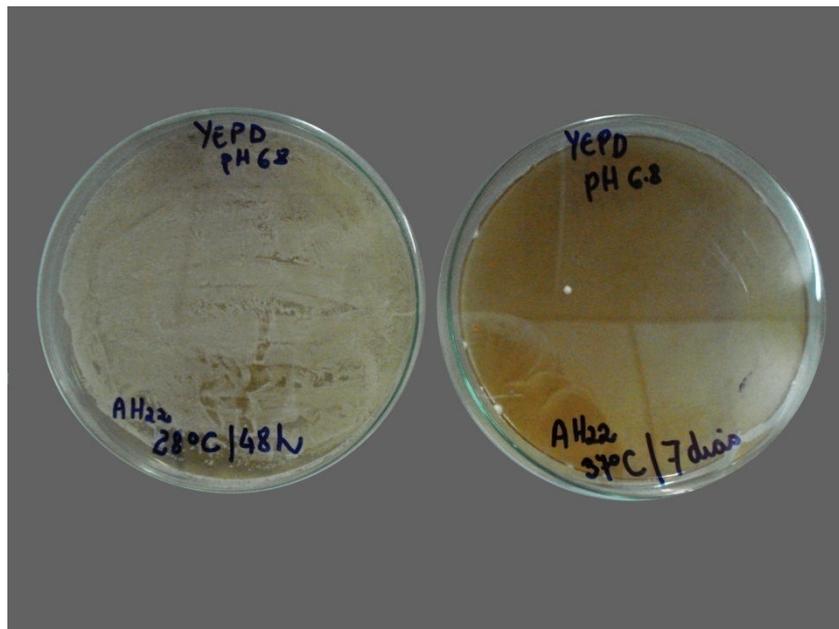


Figura 13 - *S. cerevisiae* AH22 em meio YEPD em duas temperaturas. À esquerda após 48 horas à 28°C e à direita, após 7 dias a 37°C.

A levedura AH22 não foi testada quanto à atividade, pois foi apresentada neste experimento como testadora de sensibilidade, visto que é sensível às leveduras *killer* de Polonelli.

No entanto, nem esta, e nenhuma outra apresentou uma sensibilidade universal. Especificamente no caso da AH22, esta foi sensível a 15 outras leveduras a 28°C e a 13, quando incubada à 37°C, o que demonstra que nem todas as leveduras que apresentam atividade *killer* manifestaram este caráter sobre a testadora AH22, mesmo em temperatura adequada de multiplicação. Este resultado encontra-se semelhante ao encontrado por Bertolin (1995) que identificou não haver uma linhagem testadora de atividade *killer* universal.

5 CONCLUSÕES

Candida albicans isoladas de candidíases vulvovaginais possuem atividade *killer* e antifúngica *in vitro* nas temperaturas de 28 e 37°C contra *Candida albicans* patogênicas causadoras de CVV e sobre *Saccharomyces cerevisiae* AH22, nos locais estudados.

As toxinas *killer* de *C. albicans* podem apresentar atividade *killer* superior às toxinas *killer* das testadoras K1 a K9, visto que, neste estudo, uma levedura apresentou resultado superior ao obtido pelas referidas testadoras

As toxinas *killer* de *Candida albicans* podem possuir atividade *in vivo* em temperaturas fisiológicas.

Saccharomyces cerevisiae AH22 não pode ser considerada testadora universal de sensibilidade, pois não foi sensível a todas as leveduras que demonstraram caráter *killer in vitro* neste estudo, dentro dos parâmetros avaliados.

A prevalência de espécies não *albicans* isoladas de vulvovaginites neste estudo apresenta caráter emergente, pois, a frequência correspondeu a quase metade das *Candida albicans* isoladas.

O hábito de secar calcinhas ao sol, utilizado pelas mulheres que participaram deste estudo, apresentou tendência a ser uma prática protetora em relação à prevalência de infecções vaginais causadas por leveduras.

Mais estudos são necessários a fim de isolar, purificar e identificar estas toxinas *killer* de *Candida albicans*, bem como estabelecer parâmetros de toxicidade em modelos vivos, que poderão possibilitar o desenvolvimento de alternativas às terapias existentes.

REFERÊNCIAS

- AROUTCHEVA, A, GARITI, D; SIMON, M; et al. Defense factors of vaginal lactobacilli. *Am J Obstet Gynecol.* v. 185, n. 2 August, 2001.
- AVILA-PIRES, F. D. *Princípios de Ecologia Médica.* Ed. UFSC, Florianópolis: 2000. 328p.
- BAENA-MONROY, T et. al. *Candida albicans, Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization inpatients wearing dental prosthesis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* v.10 p.27-39, 2005.
- BAROUSSE, M.M; ESPINOSA, T; DUNLAP K ; FIDEL JR, P L. Vaginal Epithelial Cell Anti-*Candida albicans* Activity Is Associated with Protection against Symptomatic Vaginal Candidiasis. *Infection and Immunity*, New Orleans, v. 73, n. 11, p. 7765–7767, nov. 2005.
- BAUTERS, T G. M. et. al. Prevalence of vulvovaginal candidiasis and susceptibility to fluconazole in women. *Am J Obstet Gynecol.* v. 187, n. 3 p. 569-574, set, 2002.
- BAZÁN-MORA, E.; SÁNCHEZ-PAREDES, E., et al. Hallazgo de *Candida albicans* en Manos de Manejadores de Alimentos. *Rev Mex Patol Clin*, v. 48, n. 1, p. 37-41, Enero - Marzo, 2001.
- BENNETT, J.E. Fármacos antifúngicos In: GILMAN, A. G.; et al. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica.* 9 ed. Tradução de Hardman, Joel G.; Limbird, Lee, L. McGraw-Hill Interamericana Editores, Rio de Janeiro: 1996, cap. 49, p. 864 – 875, Título original: The pharmacological basis of therapeutics.
- BERTOLIN, A. O. *O Caráter Killer como Fator do Estabelecimento de Contaminações por Leveduras Selvagens em Processos Contínuos de Fermentações Etanólicas.* 1995, 167 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Área de Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1995.
- BIRMAN, E G et al. *Candida albicans*: Frequency and characterization in oral cancer (Stage I) from Smokers and Drinkers. *Revista Iberoamericana de Micologia.* v. 14, p. 101-103, 1997.
- BOONE, C. et al. Yeast *KRE* genes provide evidence for a pathway of cell wall β -glucan assembly. *J. Cell Biol.* n. 110, p. 1833–1843, 1990.
- BOZANI, W. Fermentação alcoólica contínua. *Anais do Simpósio sobre Álcool. Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia do Estado de São Paulo.* ACIESP, n.27, 1980 *apud* BERTOLIN, A. O. *O Caráter Killer como Fator do Estabelecimento de Contaminações por Leveduras Selvagens em Processos Contínuos de Fermentações Etanólicas.* 1995, 167 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Área de Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1995.

BRADSHAW, C. S. *et al.* Higher-Risk Behavioral Practices Associated with bacterial Vaginosis Compared With Vaginal Candidiasis. *Obst. & Gynecol.* v. 106, n.1, jul, 2005.

BUSSEY, H; HUTCHINS, K. Cell wall receptor for yeast killer toxin: involvement of 1,6-D-glucan. *J. Bacteriol.* n. 154, p. 161–169 1983.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Discrimination between *Candida albicans* and other pathogenic species of the genus *Candida* by their differential sensitivities to toxins of a panel of killer yeasts. *Journal of Clinical Microbiology.* v. 39, n.9, p. 3362-3364, sep, 2001.

CALDERONI, R. A.; FONZI, W. A. Virulence Factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology.* v. 9, n.7, p.327-335, dez, 2001.

CECCATO-ANTONINI *et al.* Determination of Yeast Killer Activity in Fermenting Sugarcane Juice Using Selected Ethanol-making Strains. *Brazilian Archives of Biology And Technology.* v.47, n. 1, p. 13-23, Mar, 2004.

CLEFF, M. B *et al.* Isolation of *Candida* spp from Vaginal Microbiota of Healthy Canine Females During Estrous Cycle. *Brasilian Journal of Microbiology.* v. 36, p. 201-204, 2005.

CLEMONS, K. V. *et al.* Genetic Susceptibility of Mice to *Candida albicans* Vaginitis Correlates with Host Estrogen Sensitivity. *Infection and Immunity.* v. 72, n.8, p. 4878-4880, aug 2004.

COOGAN, M. M. *et. al.* *Candida* and Mycotic Infections. *Adv. Dent. Res.* v.19, p.130-138, abr, 2006.

CRUZ, K. P. A.. *Detecção de Leveduras killer entre Isolados obtidos de Substratos Vegetais Tocantinenses.* Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas). Porto Nacional, UNITINS, 2001.

ECKERT, L. O. *et al.* Vulvovaginal Candidiasis: Clinical Manifestations, Risk factors, Management algorithm. *Obstet Gynecol.* v. 92, n. 5 p. 757-765, 1998.

ECKERT, L. O. Acute Vulvovaginitis. *The New England Journal of Medicine.* v. 12, n. 355, p. 1244-1252, 2006

EHRSTRÖM, S. *Aspects on chronic stress and glucose metabolism in women with recurrent vulvovaginal candidiasis and in women with localized provoked vulvodinia.* 2007. Tese (Doutorado), Karolinska Institutet, Department of Clinical Sciences, Danderyd Hospital, Division of Obstetrics and Gynecology Estocolmo, Suécia, 2007. Disponível em: <<http://diss.kib.ki.se/2007/978-91-7357-169-2/thesis.pdf>>. Acesso em 4 de julho de 2007.

FAN, S R.; LIU, XP. Nonalbicans *Candida* Species and Antifungal Susceptibility. *International Journal of Gynecology and Obstetrics.* n.10.1016, p1-2, 2007.

FARAGE, M; MAIBACH, H. Lifetime Changes in the Vulva and Vagina. *Arch Gynecol Obstet*, San Francisco, USA, V. 273, p.195 – 202, 2006.

FERRAZA, M. H. S. H.; MALUF, M. L. F. 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*, v. 27 n.2 p. 58-63, 2005.

FIDEL JR., P. L; SOBEL, JD. Immunopathogenesis of Recurrent Vulvovaginal Candidiasis. *Clinical Microbiology Reviews*. v. 9, p. 335-348, 1996.

FIDEL JR, Paul; VASQUEZ, J. A.; SOBEL, J. D. *Candida glabrata*: Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to *Candida albicans*. *Clinical Microbiology Reviews*. v. 12, p. 80-96, jan,1999.

FIDEL JR, P. L.; CUTRIGHT, J.; STEELE, C. Effects of Reproductive Hormones on Experimental Vaginal Candidiasis. *Infection and Immunity*. v. 8, n. 2, p. 651-657, feb, 2000.

FIDEL JR., P. L. Immunity to *Candida*. *Oral diseases* v. 8, sup 2, p. 69–75, 2002.

FITZPATRICK, T. B.; et al. *Dermatologia Atlas e Texto*. 3 ed. Rio de Janeiro: The McGraw-Hill Companies. p. 718-729, 1997.

FORATTINI, O. P. *Ecologia, Epidemiologia e Sociedade*. 2.ed Artmed, Rio de Janeiro: 2004

GALLE, L. C.; GIANINNI, M. J. S. M. Prevalência e susceptibilidade de leveduras vaginais. *J. Bras. Patol. Med. Lab*. v.40, n.4, p.229-236. ago. 2004.

GIRALDO, P; NOWASKONSKI, A. V. et. al. Vaginal Colonization by *Candida* in Asymptomatic Women With and Without a History of Recurrent Vulvovaginal Candidiasis. *Obstetrics Gynecology*. v. 95, p. 413 – 416, 2000.

GIRALDO, P. C; GONÇALVES, A. C. S.; VICENTINI, R. M. R. Candidíase Extragenital. *DST- Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis*. v. 14, n. 2, p. 54-58, 2002.

GRIGORIOU, Odysseas et al. Prevalence of Clinical vaginal candidiasis in a university hospital and possible risk factors. *European Journal Of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. v. 126, p. 121-125, 2006.

HOLLAND, J. et. al. .Vulvovaginal carriage of yeasts other than *Candida albicans*. *Sex. Transm. Inf* .v. 79, p. 249-250, 2003.

HOUANG, E. T. S et al. Use of CHROMagar Candida for Genital Specimens in the Diagnostic Laboratory. *Journal of Clinical Pathology*. n. 50, p. 563-565, 1997.

JABRA-RIZK, Mary et al. Evaluation of a Reformulated CHROMagar Candida. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 39, n. 5, p. 2015- 2016, 2001.

JORGE, A. O. C. et al. Sensitivity to the *killer* toxins in *Candida* yeast isolated of oral cavity from healthy patients and oral candidosis patients. *Rev. Odontol. UNESP (São Paulo)*, v.29, n.1-2, p.71-80, 2000.

KANDEL, J.S.; STERN, T.A. Killer phenomenon in pathogenic yeasts. *Antimicrobiology Agents Chemotherapy* v. 15, p.568-571, 1979.

KLEBANOFF; COOMBS. Viricidal effect of *Lactobacillus acidophilus* on human immunodeficiency virus type 1: possible role in heterosexual transmission. *J. Exp. Med.* v.174, n.1, p. 289 – 292, jul, 1991.

LACAZ, C. et al. *Tratado de Micologia Médica Lacaz*. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LEON, E. M. et al. Prevalence and Risk Factors for Vaginal *Candida* Colonization in Woman with Type 1 and Type 2 Diabetes. *BMC Infections Diseases*. v. 2, p.1 – 6, 2002.

LO, Hsiu-Jung et al. Nonfilamentous *C. albicans* Mutants Are Avirulent. *Cell*, v. 90, p. 939–949, Sep 5, 1997.

MAGLIANI, Walter et al. Yeast Killer Systems. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 10, n. 3, p. 369-400, jul 1997.

MAKOWER, M.; BEVAN, E.A. The inheritance of a killer character in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Proceeding of the International Congress of Genetics*, The Hague ed. Geerts, S.J., v. 11, p. 202, 1963.

MARÇAL, Viviani Vieira Marques. *Isolamento e Caracterização Morfogenética de Leveduras com Fenótipo Killer e seu Potencial no Antagonismo de Fitopatógenos*. (Dissertação) Mestrado em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2005. disponível em:
<http://www.uel.br/pos/genetica/dissertacoes/viviani_mar%C3%A7al_2005.pdf>
acesso em 9 de julho de 2007.

MARQUINA, D.; SANTOS, A., PEINADO, J. M. Biology of Killers Yeasts. *Int. Microbiol.* v. 5, p. 65-71, 2002.

MEDRANO, D.J.A.; BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R.A.; ROCHA, M.F.G.; RABENHORST, S.H.B. & SIDRIM, J.J.C. - Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v. 48, n.1, p. 17-20, 2006.

MENDES, R. E.; MAZZAROLO, L. P; COLOMBO, A. et. al. Prevalence, specie distribution and antifungal susceptibility profile among *Candida* spp. Isolates from human immunodeficiency virus (HIV-1) seropositive and pregnant women. In: 102 ND CONGRESS OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY Salt Lake City, Estados Unidos, v. 1, p. 214, may, 2002.

MERZ, W. G. *Candida albicans* strain delineation. *Clin. Microb. Rev.* 3:321-334, 1990.

MIDDELBEEK, E.J. et al. High incidence of sensitivity to yeast killer toxins among *Candida* and *Totulopsis* isolates of human origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.17, n.3, p.350-354, 1980.

MIJAC, V.D., DUKIÉ; V. OPAVSKI, N. Z. et. Al. Hidrogen Peroxid Producing Lactobacilli in Women with Vaginal Infections. *European Journal of Obstetrics and Reproductive Biology*. v.129, p. 69-76, 2006.

MORACE, G. et al. Strain differentiation of pathogenic yeast by the killer system. *Mycopathologia*, 84:81-85, 1984.

MOREIRA, D.; PAULA, C. R. Vulvovaginal candidiasis. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. v. 92, p. 266-267, 2006.

NETO, Antônio Aleixo; HAMDAN, Júnia Soares; SOUZA, Ressala Castro. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. v.21, n.8, p441-445, 1999.

NEWMAN, David J. et al. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. *J. Nat. Prod.*, v.66, n.7 p.1022-1037, jul, 2003.

OLIVEIRA, Elida Elias et al. Toxinas killer e produção de enzimas por *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes com câncer. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* v. 31, n.6, p.523-527, nov-dez, 1998.

OZCAN, Selma Keceli et al. Prevalence, Susceptibility, Profile and Proteinase Production of Yeasts Causing Vulvovaginitis in Turkish Woman. *APMIS*. v.45, n. 114, p. 139-144, 2006.

PFALLER, M. A.; HOUSTON, A.; COFFMANN, S. Application of CHROMagar *Candida* fir Rapid Screening of Clinical Specimens for *Candida tropicalis*, *Candida krusei* and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 34, n.1, p. 58-61, jan 1996.

PHILLISKIRK, G.; YOUNG, T.W. The occurrence of killer character in yeast of various genera. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v.43, p. 125-128, 1975

POLONELLI, L. et al. Killer System: a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 17, n.5, p.774-780, may. 1983.

POLONELLI, L; et al. Yeast Killer Toxins and Dimorphism. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 27, n.6, p. 1423-1425, jun 1989.

RAHMAN, Durdana et al. Murine Model of concurrent oral and vaginal *Candida albicans* colonization to study epithelial host-pathogen interactions. *Microbes and Infection*. v. 9, p. 615-622, 2007.

RICHTER, Sandra S. et al. Antifungal Susceptibilities of *Candida* Species Causing Vulvovaginitis and Epidemiology of Recurrent Cases. *Journal of Clinical Microbiology*. n. doi 101128, p. 2155-2162, 2005.

ROSA, Maria Inês; RUMEL, Davi. Fatores Associados à Candidíase Vulvovaginal: Estudo Exploratório. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. v. 26, n. 1, p. 65-70, 2004.

RYLANDER, E.; BERGLUND, A-L; PETRINI. Vulvovaginal *Candida* in a Young Sexually Active Population: Prevalence and Association With Oro-Genital Sex and Frequent Pain at Intercourse. *Sex. Transm Infect.* v. 80, p. 54-57, 2004.

SANT'ANA, Priscilla de Laet. Multicenter Brazilian Study of Oral *Candida* Species Isolated from Aids Patients. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 97, n.2, p. 253-257, Mar, 2002.

SANTOS, A; MARQUINA, D. Killer Toxin of *Pichia membranifaciens* and its Possible Use as a Biocontrol Agent Against grey Mould Disease of Grapevine. *Microbiology* v.150, p. 2527-2534, 2004.

SIDRIM, J. J. S.; ROCHA, M. F. G. *Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos*. Guanabara Koogan, 2004.

SCHMITT, Manfred J.; BREINIG, Frank. The Viral Killer System in Yeast: from molecular biology to application. *Fems Microbiology Reviews*. v. 26, p.257-276, 2002.

SCHMITT, M ; RADLER, F. Molecular structure of the cell wall receptor for killer toxin KT28 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* V. 170, p. 2192–2196,1988.

SCHWIERTZ, Andreas. et al. Throwing the Dice for the Diagnosis of Vaginal Complaints? *Annals fo clinical Microbiology and Antimicrobials*. v. 5, n.4 p. 1-7, 2006.

SOBEL, Jack D.; CHAIM, Walter. Vaginal Microbiology of Women with Acute Recurrent Vulvovaginal Candidiasis. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 34, n.10, p. 2497-2499, oct, 1996.

SOBEL, Jack D. Pathogenesis and epidemiology of vulvovaginal candidiasis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, n.544, p. 544-547, 1988.

_____.Vulvovaginal Candidosis. *Lancet*. v. 369, n.10, p. 1961-1971, 2007.

SOUZA, W. A; SIQUEIRA, Q. M. Ocorrência de *Candida albicans* no intestino de bovinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária*, Belo Horizonte, v.55, n. 3, p. 262-265, jun. 2003.

STARMER, W. T. et al. The ecological role of killer yeasts in natural communities of yeasts. *Canadian Journal of Microbiology*. v. 33 p. 783–796, 1987.

TARRY, W. et al. *Candida albicans*: The Estrogen Target for Vaginal Colonization. *Journal of Surgical Research*. v. 129, n. 2, p. 278-282, dez, 2005.

- TRAVASSOS, L. R. et al. Therapeutic activity fo a killer peptide against experimental paracoccidioidomycosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v.54, p. 956-958, sep. 2004.
- VAN-BURIK, J.A H; MAGEE, P. T.; Aspects of fungal pathogenesis in humans. *Ann. Rev. Microbiol.* n. 55, p 743-772, 2001.
- VENTOLINI, G et al. Recurrent Vulvovaginal Candidiasis. *Clinical Microbiology Newsletter*. Elsevier, 28 nov 2006.
- XU, Jianping; MITCHELL, Thomas G. Geographical Differences in Human Oral Yeast Flora. *Clinical Infection Diseases*. v. 36, p. 221- 224, 2003.
- WOODS, D.R.; BEVAN, E.A. Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, v.51, p. 115-126, 1968.
- YOUNG, T. W.; YAGIU, M. A comparasion of the killer character in different yeast and its classification. *Antonie Van Leewenhoeck, Journal Microbiology Serology*, v.44, p. 59-77, 1978.
- ZHANG, Xiaoqian et al. Estrogen Effects on *Candida albicans*: A Potential Virulence-Regulating Mechanism. *The Journal of Infections Diseases*. v. 181, p. 1441-1446, apr, 2000.
- ZHOU, Xia et al. Characterization of Vaginal Microbial communities in Adult Heathy Women using cultivation-independent Methods. *Microbiology*.v. 150, p. 2565-2573, 2004.

APÊNDICES

**APÊNDICE 1 - OFÍCIO À SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DE ARAGUAINA
SOLICITANDO AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DE
PESQUISA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
MESTRADO EM CIÊNCIAS DO AMBIENTE

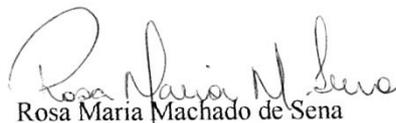
À
Dr^a. Aurea Maria Casagrande da Luz
Exma. Secretária Municipal de Saúde de Araguaína –TO

Prezada Secretária,

Venho por meio desta solicitar a autorização de V. S^a para realizar meu projeto de Mestrado em Ciências do Ambiente pela Universidade Federal do Tocantins, sob a orientação do Dr. Aparecido Osdimir Bertolin denominado **Utilização de toxinas “killer” de *Candida albicans* para controle “in vitro” de *C. albicans* causadoras de infecções vulvovaginais**, junto ao serviço de Ginecologia do município de Araguaína. Devo esclarecer que a pesquisa prevê coleta de secreções vaginais nas pacientes e aplicação de questionários para verificação de fatores predisponentes de tais infecções. Trata-se de uma pesquisa realizada inteiramente em nosso estado e que a médio prazo poderá trazer benefícios para uma parcela significativa da população feminina. A demanda será espontânea e apenas para as pacientes que aceitarem participar do estudo. Em anexo encontra-se o projeto completo para apreciação de V. S^a.

Desde já agradeço,

Atenciosamente,



Rosa Maria Machado de Sena

Mestranda em Ciências do Ambiente da Universidade Federal do Tocantins

rm.sena@uol.com.br

63- 8111-1004

APÊNDICE 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você /a Sra. está sendo convidada a participar, como voluntária em uma pesquisa, isto é; poderá aceitar ou não e desistir a qualquer momento. Após ser esclarecida sobre as informações a seguir, no caso de aceitar participar do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra da pesquisadora responsável. Em caso de se recusar a participar, você /a Sra. não será penalizada de forma alguma, e, durante a entrevista você/a Sra. poderá se recusar a responder qualquer pergunta que possa lhe causar algum constrangimento. Em caso de dúvida você/ A Sra. pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical do Tocantins (FMT) através dos telefones (63) 34158300.

TÍTULO DA PESQUISA:

UTILIZAÇÃO DE TOXINAS “KILLER” DE *Candida albicans* PARA CONTROLE *IN VITRO* DE *C. albicans* CAUSADORAS DE INFECÇÕES VULVOVAGINAIS

Estamos fazendo uma pesquisa sobre candidíase, que é uma doença (micose) causada por um fungo chamado Cândida. Quem tem esta doença, tem vermelhidão, corrimento e coceira por dentro e por fora da vagina. Nesta pesquisa, vamos fazer um teste usando o corrimento vaginal, para saber se ele é causado pela Cândida, pois nem todo o corrimento é causado por Cândida. Se o resultado for positivo, vamos testar no laboratório para ver se é possível matar esta Cândida.

Para isso, precisamos colher um pouco do corrimento de dentro da sua vagina, usar para fazer os testes e guardar para a pesquisa. A senhora não vai correr riscos de pegar outra doença, porque os materiais são esterilizados e todos os cuidados serão tomados. O tempo necessário é o de uma consulta médica e o material é retirado pelo médico ou pela pesquisadora.

Também vamos fazer algumas perguntas para saber se tem algum motivo que faz você /a senhora e as mulheres terem a candidíase, como suor, tipo de roupas que a senhora/você usa, doenças que já teve e outras.

Se o teste que vamos fazer conseguir matar ou diminuir a quantidade de Cândida no laboratório, vamos tentar fazer um remédio para tratar esta doença, mas não vai servir para o seu tratamento desta vez.

Pesquisadora responsável: Rosa Maria Machado de Sena

Contato pelo telefone: (63) 8111-1004

Eu, _____, declaro ter sido esclarecida sobre a pesquisa especificada acima e ter entendido as explicações dadas neste texto e pela pesquisadora e concordo em participar da pesquisa e responder o questionário. Estou ciente de que meu nome não será citado em nenhum momento da pesquisa.

Araguaína, _____ de _____ de 2006.

Assinatura da voluntária: _____

**APÊNDICE 3 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO:
ESCLARECIMENTO PARA PESQUISA COM MENOR**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ESCLARECIMENTO PARA PESQUISA COM MENOR

A menor sob sua responsabilidade está sendo convidada a participar, como voluntária nesta pesquisa, isto é, ela pode aceitar participar ou não e também poderá desistir a qualquer momento. A participação dela depende de sua autorização.

TÍTULO DA PESQUISA:

UTILIZAÇÃO DE TOXINAS “KILLER” DE *Candida albicans* PARA CONTROLE *IN VITRO* DE *C. albicans* CAUSADORAS DE INFECÇÕES VULVOVAGINAIS

Estamos fazendo uma pesquisa sobre candidíase, que é uma doença (micose) causada por um fungo chamado Cândida. Quem tem esta doença, tem vermelhidão, corrimento e coceira por dentro e por fora da vagina. Nesta pesquisa, vamos fazer um teste usando o corrimento vaginal, para saber se ele é causado pela Cândida, pois nem todo o corrimento é causado por Cândida. Se o resultado for positivo, vamos testar no laboratório para ver se é possível matar esta Cândida.

Para isso, precisamos colher um pouco do corrimento de dentro da sua vagina da menor sob sua responsabilidade, usar para fazer os testes e guardar para a pesquisa. A menor não vai correr riscos de pegar outra doença, porque os materiais são esterilizados. E todos os cuidados vão ser tomados para preservar sua saúde. O tempo necessário é o de uma consulta médica e o material é retirado pelo médico ou pela pesquisadora.

Também vamos fazer algumas perguntas para saber se tem algum motivo que faz com que a menor tenha a candidíase, como suor, tipo de roupas que ela usa, doenças que já teve e outras.

Se o teste que vamos fazer conseguir matar ou diminuir a quantidade de Cândida no laboratório, vamos tentar fazer um remédio para tratar esta doença, mas não vai servir para o tratamento dela desta vez.

Caso aceite participar do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra da pesquisadora responsável. Durante a entrevista a Sra/ o Sr. e a menor poderão se recusar a responder qualquer pergunta que possa causar algum constrangimento ou que não queiram responder. Em caso de dúvida a Sra. pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical do Tocantins (FMT) através dos telefones (63) 34133964 ou (63) 34133956.

Pesquisadora responsável: Rosa Maria Machado de Sena
Contato pelo telefone: (63) 8111-1004

Eu, _____, declaro ter sido esclarecida sobre a pesquisa especificada acima e ter entendido as explicações dadas neste texto e pela pesquisadora e concordo em participar da pesquisa e responder o questionário. Estou ciente de que meu nome não será citado em nenhum momento da pesquisa.

Araguaína, _____ de _____ de 2006.

Assinatura da voluntária: _____

Responsável: (menor) _____

APÊNDICE 4 - QUESTIONÁRIO APLICADO

Setor _____ data _____ prontuário _____

PESQUISA SOBRE FATORES SOCIOAMBIENTAIS CONDICIONANTES PARA CANDIDÍASES VULVOVAGINAIS

Nome: _____

Data: _____ Idade: ____ Estado civil: casada: () solteira: () última menstruação _____

Naturalidade: _____

Residência atual: Rua _____

Reside há quantos anos em Araguaína: Menos de 1 ano () 1 a 5 anos () mais de 5 anos ()

Antes de morar aqui morou: Em outra cidade do Tocantins: _____

Na região norte: () Em outras regiões do país: () Qual? _____

Mora em: Casa própria ou da família sem pagar aluguel: () Paga aluguel: () Valor: _____

Quantas pessoas moram na sua casa: 1: () 2 a 4: () 5 a 8: () mais de 8: ()

Aspectos da residência

Recebe água encanada da Saneatins? : sim: () não: ()

Recebe água encanada da Saneatins e usa água de poço: () Usa somente água de poço: () usa água do vizinho: () outra resposta: ()

Sua casa tem rede de esgoto? Sim: () não: () Tem fossa? _____

Tem banheiro dentro de casa: () Tem banheiro fora de casa: () Não tem banheiro: ()

Obs: _____

Renda familiar:

Qual é a renda familiar mensal?

Até um salário mínimo (SM) por mês: () 1 a 3 SM por mês: ()

3 a 5 SM por mês: () 5 a 10 SM por mês: () Mais de 10 SM mês: ()

Não sabe ou não respondeu: ()

Características Pessoais

Peso: _____ kg Altura: _____ m IMC: _____

Aspectos relacionados à saúde

Você tem ou já teve essas doenças?

Diabetes: () Problemas renais: () Cistite/infecção urinária: () Câncer: ()

Asma/bronquites: () alergias: () reumatismo: () artrose: ()

Quando? Nos 3 últimos meses () 3 a 6 meses atrás () há mais de 6 meses atrás ()

Usou remédio para estas doenças? Não: () sim: () não sabe: ()

Qual(is) _____ tomou, mas não se lembra o nome: ()

Quanto à presença de corrimento vaginal:

Você tem atualmente corrimento vaginal?: sim: () não: () Já teve antes: sim: () não: ()

Quando teve corrimento procurou o médico? sim: () não: () Foi tratada com: remédios

receitados pelo médico: () Comprados na farmácia sem receita médica: () Usou garrafadas ou

outro tratamento à base de plantas: () não tratou e melhorou: () não tratou e não melhorou: ()

NR: ()

Quanto à menstruação:

Quantos dias dura a sua menstruação:

Até 3 dias () 4 a 5 dias () 6 dias ou mais ()

Costuma ter coceiras e ou corrimento vaginal nos dias antes de menstruar? Não: () sim: ()

Quanto à utilização de remédios:

Está tomando algum remédio atualmente?

Não: () sim () Qual _____
Faz reposição hormonal não: () sim () qual _____

Evita engravidar: não() Sim() Com remédio/pílula ora l()
qual _____ injetável () qual _____
óvulos vaginais: () preservativos() coito interrompido: ()
abstenção sexual /não tem relações sexuais ()
Outros métodos () qual? _____
Não soube ou não quis responder _____

Quanto aos hábitos de vestir: Você usa:

Somente saia ou vestido () Saia/vestido e calça comprida/bermuda: ()
Só usa calça comprida/bermuda ()
Uso de saia ou vestido:
usa saia de 2 a 6 dias por semana: () 1 vez por semana: ()
Menos de 1 vez por semana: ()
Pano: sintético: () Algodão: () outro _____
Sobre o modelo de calça comprida:
Justa que modela bastante o corpo : () Folgada () outra resposta _____
Tecido: algodão: () Sintético :que não amassa : () não sabe/ NR ()

Calcinha:

Lycra sempre : () Algodão sempre: () Algodão e às vezes lycra: () Lycra e às vezes algodão ()
Outra resposta: _____
Modelo de calcinha: Somente tanga () Tanga e outro modelo: ()
Somente outro modelo: ()

Uso de absorvente/Modess/Sempre livre

Usa absorvente Interno (tipo OB/Tampax) sempre e só ele ()
Usa absorvente Interno (tipo OB/Tampax) sempre e junto com absorvente externo ()
sempre e somente o interno () não usa absorvente interno ()
Só usa absorvente interno quando vai banhar na piscina/praias ()
Usa somente absorvente tipo modess: ()
Troca quantas vezes por dia: interno: 1 () 2 () 3 ou mais vezes: ()
Troca quantas vezes por dia: externo: 1 () 2 () 3 ou mais vezes: ()

Absorvente diário

Usa absorvente diário tipo Carefree: não: () sim: ()
Todos os dias:() somente 3 a 5 dias antes de menstruar: () outra resposta ()

Aspectos relacionados à higiene

Quantos banhos toma por dia quando está menstruada 1 () 2 () mais de 2 banhos ao dia ()
Não se banha quando está menstruada () Toma 1 ou mais banhos completos e faz também higiene na região genital: ()

Em dias normais você se banha: pelo menos 1 vez ao dia: () 2 vezes

Mais de 2 vezes: ()
Usa sabonete:Neutro: () Comum: () Antisséptico/medicinal: () Sabonete líquido ()
Outra resposta _____ NR _____
Usa desodorante íntimo? Sim :() não; () Usa perfume na região genital? sim:() não: ()

Transpiração

Seu suor molha sua calcinha durante o dia? Sim: () não: ()
Quando molha sua calcinha, você:
Toma banho e troca a calcinha: () troca a calcinha: () não faz nada: ()

Onde lava a calcinha:

Só no banheiro () No banheiro e tanque/pia: () No tanque/pia ()
Máquina de lavar/tanquinho() Outro lugar: ()

Você usa para lavar a calcinha;

Sabonete() Sabão de coco:() Sabão em barra() sabão em pó () outro() qual? _____

Onde seca a calcinha:

Banheiro () Quarto () Área fechada em quitinete ()

Área de serviço aberta dentro de casa: () Varal no quintal/área aberta que bate sol ()

Seca com ferro de passar () outra resposta _____

Passa o fundo da calcinha com ferro após secar? Sim: () não: ()

Ao urinar você:

Seca com papel higiênico no sentido vagina-ânus: ()

Seca com papel higiênico no sentido ânus-vagina: ()

Lava e seca com papel higiênico/toalha: () Não seca()

Ao evacuar (fazer cocô) você:

Limpa-se com papel higiênico: no sentido vagina-ânus: () no sentido ânus-vagina: ()

Lava-se e seca com papel higiênico/toalha: ()

Se banha e seca-se com toalha: () Outra resposta _____

Não respondeu ()

Obs: _____

Quanto ao papel higiênico:

Compra e usa pelo preço mais baixo: () Escolhe o mais macio: ()

Compra o mais barato, desde que tenha perfume() Usa um de qualidade média()

Outra resposta: _____ Não soube/quis responder: ()

Depilação:

Como é feita sua depilação?

Casa: () salão: () Cera quente:() cera fria:() lâmina tipo Gillete: () Descartável tipo

Prestobarba: () Usa ap. descartável 1 vez() 2 a 3 vezes: () mais de 3 vezes:()

Divide seu Prestobarba com alguém? Sim: () não: ()

Quanto às relações sexuais

Você tem relações sexuais:

Entre 1 e 3 vezes por semana:() Mais de 3 vezes por semana: ()

1 vez por mês: () Menos de 1 vez por mês: () Não pratica; () NR: _____

Faz sexo:

vaginal:() anal() Somente sexo vaginal () Quando faz sexo utiliza preservativos? Sim, sempre: () não() algumas vezes: () NR _____

Quando faz sexo anal, costuma fazer sexo vaginal logo após com o mesmo preservativo, ou sem se banhar? Sim:() não: () às vezes: () não respondeu _____

Tem hábitos de se banhar após as relações sexuais?

Sempre: () às vezes:() nunca: () não respondeu:()

Aspectos relacionados às condições climáticas do estado.

Mudou-se há menos de 5 anos para o Tocantins:

Há quanto tempo mora no Tocantins? _____

Você percebeu aumento da transpiração corporal após mudar para o Tocantins?

Sim: () não: () não aumentou, diminuiu: ()

Aumentou a incidência de:Alergias; sim:() não:() Coceiras: sim: () não: ()

Corrimento vaginal: sim: () não: () infecção urinária: sim: () não: () _____

candidíase: sim: () não:() outras doenças: _____

ANEXOS

ANEXO 1 – OFÍCIO DA SECRETARIA DE SAÚDE AUTORIZANDO A PESQUISA



ESTADO DO TOCANTINS
PREFEITURA MUNICIPAL DE ARAGUAÍNA
SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE – ATENÇÃO BÁSICA
CGC 01.830.793/0001-39



Ofício nº 123/06 – AB/CM

Araguaína, 30 de Maio de 2006.

Ilm^a Sr^a Rosa Maria Machado de Sena

Mestranda em Ciências do Ambiente da Universidade Federal do Tocantins

Ilustríssima Senhora,

Em resposta à vossa solicitação para autorização desta Secretaria de Saúde para realizar pesquisa de caráter científico nas Unidades de Saúde aonde desenvolvem o Programa da Mulher, venho respeitosamente através deste informar a V. S^a que autorizo o desenvolvimento da pesquisa, desde que sejam garantidos os seguintes aspectos:

- Que a pesquisa ocorra em duas Unidades de Saúde: Policlínica do Setor Couto Magalhães (fone: 3411-7042) e Centro de Saúde Araguaína Sul (fone: 3412-3019).
- Que haja o consentimento por parte dos profissionais Enfermeiros em realizar a coleta de BSV (bacterioscopia de secreção vaginal) e, esta deverá ser oportunizada no momento da coleta de PCCU.
- Que haja o consentimento das mulheres atendidas nas UBS, na coleta do referido material.
- Que V. S^a deverá se responsabilizar pelo material, acondicionamento, transporte, análise do material coletado, bem como disponibilizar os laudos de resultados para as devidas condutas dos casos nas UBS.
- A aplicação dos questionários deverá ser de responsabilidade de V. S^a às mulheres que consentirem participar do estudo.

Atenciosamente,

Áurea M^a Casagrande da Luz
Secretária Mul. de Saúde
Dec. nº 002/2005
Áurea Maria Casagrande da Luz

Secretária de Saúde do Município de Araguaína – TO

Secretaria Municipal de Saúde de Araguaína, Rua Zico Monteiro nº 290. Centro
Fones: 3411-7041 (Gabinete); 3411-7083 (Atenção Básica); 3411-7138 (PACS/PSF)

ANEXO 2 – CARTA DE APRESENTAÇÃO DA MESTRANDA AOS POSTOS DE SAÚDE, FORNECIDA PELA SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE

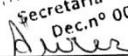


ESTADO DO TOCANTINS
PREFEITURA MUNICIPAL DE ARAGUAÍNA
SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE – ATENÇÃO BÁSICA
CGC 01.830.793/0001-39

CARTA DE APRESENTAÇÃO

Em virtude de solicitação prévia e autorização por esta Secretaria para a Senhora Rosa Maria Machado de Sena, mestranda em Ciências do Ambiente da Universidade Federal do Tocantins para a realização de pesquisa científica, **obedecendo aos critérios éticos, respaldados pela Resolução 196/96 – CNS/MS**, venho por meio desta comunicar à Direção da Policlínica do Setor Couto Magalhães e do Centro de Saúde Araguaína Sul que esta Senhora está autorizada a realizar a pesquisa científica intitulada **“Utilização de toxinas “Killer” de *Cândida albicans* para controle “in vitro” de *C. albicans* causadoras de infecções vulvovaginais, que consiste em realizar coletas de secreção vaginal (BSV) oportunizadas durante as coletas de PCCU, em mulheres que estiverem com suspeita clínica de candidíase vulvovaginal, desde que haja o livre consentimento das mesmas.** Vale ressaltar que deverão ser assegurados os direitos dos sujeitos contidos na referida Resolução e demais contidos no Ofício de N° 123/06 – AB/CM de 30/05/06 enviados à autora da Pesquisa.

Atenciosamente,

Aurea M^o Casagrande da Luz
Secretária Mul. de Saúde
Dec. n.º 002/2005

Aurea Maria Casagrande da Luz
Secretária Municipal de Saúde

ANEXO 3 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA

PARECER CONSUBSTANCIADO

PROJETO DE PESQUISA

X

PROCESSO Nº

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

059

O parecer consubstanciado do relator será utilizado como subsídio para o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical do Tocantins elaborar seu parecer final.

1 – Identificação da Proposta de Projeto de Pesquisa/Trabalho de Conclusão de Curso

Título:

Utilização de toxinas de "killer" de *Cândida albicans* para controle IN VITRO de *C. albicans* causadoras de infecções vulvovaginais.

Coordenador do Projeto ou Professor Orientador do TCC:

Aparecido Osdimir Bertolin

Aluno(a) Participante (TCC):

Rosa Maria Machado de Sena

Curso/ Faculdade:

Universidade Federal do Tocantins

2 – Análise do Projeto de Pesquisa/Trabalho de Conclusão de Curso

Projeto altamente relevante e viável.

2.1 – **Objetivos e Adequação metodológica** (Verificar a exequibilidade da proposta, isto é, se existe clareza do objeto, compatibilidade entre os objetivos, a fundamentação teórica e a metodologia ou plano de ação, evidenciando consistência entre objetivos, procedimentos, ações de execução da pesquisa e capacidade do proponente, demonstrada por outros trabalhos similares.)

Satisfatórios.

2.2 – Avaliação do Questionário a ser aplicado e do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:

Adequado.

2.3 – Revisão Bibliográfica

Contemplam as normas da ABNT.

3 – **Qualificação do Pesquisador/Orientador** (Indicar os atributos do Pesquisador/Orientador, salientando a titulação e experiência compatível com a função de orientação; qualidade e regularidade da produção científica/tecnológica/artística, compatível com o projeto de pesquisa/Trabalho de Conclusão de Curso)

Orientador com larga experiência sobre o tema.

4 – Parecer conclusivo, recomendações e/ou sugestões:

Projeto altamente viável.



5 - Pendências: (Enumerar sucintamente as pendências a serem sanadas pelo Coordenador do Projeto de Pesquisa/Trabalho de Conclusão de Curso)

Aprovado.

6 - Parecer Consubstanciado

Aprovado

Aprovado com recomendações

Pendências

Não aprovado

Rubiana M. Nunes
Rubiana Magalhães Nunes
PRESIDENTE - Comitê de Ética em Pesquisa
Fundação de Medicina Tropical do Tocantins



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)