

Avaliação do potencial virulento de leveduras causadoras de infeção urinária e sua relação com a candidose vulvovaginal

Após realização da prova pública

Filipa Daniela Oliveira Castro

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biomédicas
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutora Joana Rita Gonçalves Araújo Rolo Mateus
Coorientador: Prof. Doutora Paula Pestana
Coorientador: Prof. Rita Ferrão

Agosto de 2024

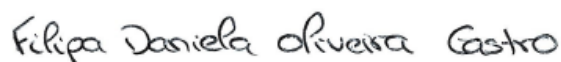
Folha em branco

Declaração de Integridade

Eu, Filipa Daniela Oliveira Castro, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M12954 de Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências da Saúde, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 21 /08 /2024



Filipa Daniela Oliveira Castro

Folha em branco

"A ciência não é apenas uma disciplina de razão,
mas também de romance e paixão."

- *Stephen Hawking*

Folha em branco

Para aqueles que sempre acreditaram em mim...

Folha em branco

Agradecimentos

A finalização desta dissertação, tem sido uma jornada transformadora não só na minha vida académica, como a nível pessoal em que tive o prazer de me cruzar com pessoas que me impulsionaram conhecimento e valores, a quem devo o meu respeito e gratidão.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus pais e irmão pois sem eles nada disto seria possível. À minha mãe por sempre me motivar em seguir os meus sonhos, ao meu pai que nunca me deixou desistir do que fosse e ao meu irmão pela companhia e paciência em todas as horas. Por isso, um obrigado gigantesco por tudo, sem dúvida não poderia ter tido mais sorte!

Gostaria de agradecer ao principal pilar fulcral desta dissertação, a minha orientadora Professora Joana Rolo, pelo voto de confiança ao aceitar colaborar neste projeto e pela transmissão de conhecimento, simpatia, disponibilidade e também pela diversão com que sempre demonstrou encarar cada fase.

Agradeço à Professora Paula Pestana, pelas sugestões, motivação, confiança e prontidão em esclarecer as minhas dúvidas.

Agradeço à técnica Rita Ferrão pelo apoio e conselhos dados ao longo desta jornada.

Agradeço a todo o grupo de investigação, pelos bons conselhos e oportunidades de promover o meu conhecimento e por me integrarem nesta família desde o início. Em especial, à Carolina, à Pires, à Cátia e à Ana pelo trabalho em equipa, pela companhia, pelos ensinamentos, por me tornarem ainda melhor.

À avó Milinha do Posto e ao avô Tónio, a quem tenho um orgulho enorme de chamar padrinhos, um obrigado pelo cuidado e carinho, pelos valores, pelos sábios conselhos, pelas histórias e risadas vividas. Deveriam ser eternos, meus queridos avós!

Ao Ruben, o meu companheiro e amigo que me acompanha desde a licenciatura, obrigada por estares sempre lá, pelo amor, paciência e dedicação.

Por fim, quero agradecer aos camaradas que me acompanharam nesta aventura, em especial à Xana, ao Henrique, à Marlene, à Maria João e à minha gémea Mariana, pelas sessões de terapia, pelas rezas do bendito 9,5 nas horas de desespero, pelo suporte, risadas e memórias que levo para a vida.

Folha em branco

Resumo

A frequência das infecções fúngicas tem vindo a aumentar nos últimos tempos devido à crescente resistência aos antifúngicos, e por isso, têm-se tornado mais relevantes, especialmente em indivíduos com condições de saúde subjacentes ou com sistema imunológico enfraquecido. Por outro lado, atualmente, estima-se que cerca de 150 milhões de pessoas são afetadas por infecções do trato urinário (ITU) todos os anos, sendo que uma em cada cinco mulheres adultas tem pelo menos um episódio durante a sua vida. Enquanto isto, a candidose vaginal está associada ao crescimento excessivo das espécies de *Candida*, que por sua vez, tem um impacto significativo na saúde sexual das mulheres. Embora, as infecções por *Candida* constituam um problema na saúde pública a nível mundial, a sua caracterização epidemiológica no trato geniturinário é difícil de determinar, devido à falta de estudos que correlacionam os dois nichos.

O objetivo deste estudo foi estudar a relação entre a micobiota vaginal e urinária dos quadros clínicos de infecções vaginais e infecções urinárias causadas por *Candida*, através da suscetibilidade aos antifúngicos, da formação de biofilmes e tubo germinativo, assim como a adesão in-vitro às células HeLA de isolados clínicos.

Os resultados evidenciaram maior suscetibilidade antifúngica e formação de tubo germinativos em isolados de uroculturas masculinas. Porém, as leveduras dos isolados de mulheres, demonstraram maior capacidade de infecção e adesão. Contudo, os isolados que mostraram maior patogenicidade são de utentes hospitalizados e de idade avançada.

Deste modo, observa-se uma maior patogenicidade em isolados provenientes de utentes femininas com infecção urinária. Neste sentido, considera-se necessária a vigilância epidemiológica, auxiliando o diagnóstico com a correlação de estudos clínicos e a confirmação da presença da levedura.

Palavras-chave

Candida; fatores virulência; infecções nosocomiais; resistência antifúngica; trato genito-urinário

Folha em branco

Abstract

Fungal infections have been on the rise recently due to increasing resistance to antifungal drugs, and therefore become more virulent, especially in individuals with underlying health conditions or weakened immune systems. Currently, an estimated 150 million people are affected by urinary tract infections (UTIs) every year, with one in five adult women having at least one episode in their lifetime. Meanwhile, vaginal candidiasis is associated with the overgrowth of *Candida* species, which in turn has a significant impact on women's sexual health. Although *Candida* infections are a public health problem worldwide, their epidemiological characterization in the genitourinary tract is difficult to determine due to the lack of studies correlating the two niches.

The aim of this study was to investigate the relationship between the vaginal and urinary microbiota in clinical cases of vaginal infections and urinary infections caused by *Candida*, through assessment of antifungal susceptibility, biofilm and germ tube formation, as well as in-vitro adhesion to HeLA cells.

The results showed greater antifungal susceptibility and germ tube formation in isolates obtained from male urocultures. Although, in isolates obtained from females, showed a greater capacity for infection and adhesion. However, overall, the isolates that showed greater pathogenicity were from hospitalised and elderly patients.

This leads to the conclusion that there is greater pathogenicity in isolates obtained from female patients with urinary tract infections. Epidemiologic surveillance is needed to support diagnosis, that requires correlation with clinical studies and confirmation of the presence of the yeast.

Keywords

Antifungal resistance; *Candida*; Genitourinary tract; Nosocomial infections; Virulence factors

Folha em branco

Índice

1.	Introdução	1
1.1.	Microbiota urinário	2
1.2.	Microbiota vaginal	3
1.3.	Candidose	4
1.3.1.	Candidose urinária	5
1.3.2.	Candidose vulvovaginal	5
1.4.	Leveduras da família <i>Debaryomycetaceae</i>	6
1.4.1.	Gênero <i>Candida</i> spp.	6
1.4.1.1.	<i>Candida albicans</i>	7
1.4.1.2.	<i>Candida parapsilosis</i>	7
1.4.1.3.	<i>Candida guilliermondii</i>	8
1.4.1.4.	<i>Candida ciferrii</i>	8
1.5.	Leveduras da família <i>Saccharomycetaceae</i>	9
1.5.1.1.	<i>Nakaseomyces glabratus</i>	9
1.6.	Fatores de virulência.....	10
1.6.1.	Adesão e formação de biofilmes	11
1.6.2.	Tubo germinativo.....	12
2.	Objetivo.....	13
3.	Materiais e métodos.....	15
3.1.	População em estudo	15
3.2.	Recolha de dados	15
3.3.	Materiais e reagentes	15
3.4.	Pré-inoculo das leveduras.....	16
3.5.	Avaliação da suscetibilidade antifúngica	17
3.6.	Avaliação da capacidade de formação de biofilmes.....	18
3.7.	Avaliação da capacidade de formação de tubo germinativo.....	19
3.8.	Avaliação da adesão nas células HeLa	20

3.9.	Análise estatística	23
3.10.	Considerações éticas	24
4.	Resultados.....	25
4.1.	Caraterização da população em estudo	25
4.2.	Análise comparativa	28
4.2.1.	Relação da faixa etária entre os isolados urinários e vaginais.....	28
4.2.2.	Relação do estado clínico entre os isolados urinários e vaginais	30
4.2.3.	Relação da distribuição das espécies entre amostras urinárias	31
4.3.	Atividade antimicrobiana	33
4.4.	Formação de biofilme	34
4.4.1.	Visualização da formação de biofilme	36
4.5.	Formação de tubo germinativo.....	39
4.6.	Adesão da <i>C. albicans</i> às células HeLa	41
4.6.1.	Visualização da adesão nas células HeLa	42
5.	Discussão	45
6.	Conclusão.....	51
7.	Limitações e perspectivas futuras	53
8.	Referências bibliográficas	55
	Anexo I - Parecer da comissão de ética do CHUCB.....	64

Folha em branco

Lista de Figuras

Figura 1 – Representação de alguns tipos de candidose.	4
Figura 2 – Ilustração esquemática do procedimento da realização dos ensaios da atividade antimicrobiana.	18
Figura 3 – Ilustração esquemática dos ensaios para a determinação da capacidade de formação de biofilmes.	19
Figura 4 – Ilustração esquemática dos ensaios para a quantificação de tubos germinativos formados.	20
Figura 5 - Representação da placa de 24 poços com suspensão da linha celular.	22
Figura 6 – Representação do esquema da infecção da linha celular com a <i>C. albicans</i> nos poços para a placa SDA.	23
Figura 7 - Representação gráfica da distribuição dos isolados de uroculturas por género.	25
Figura 8 - Representação gráfica da distribuição dos pacientes masculinos com infecção urinária segundo faixa etária.	28
Figura 9 - Representação gráfica da distribuição das pacientes femininas com infecção urinária segundo faixa etária.	29
Figura 10 - Representação gráfica da distribuição das pacientes com candidose vaginal segundo faixa etária.	29
Figura 11 - Representação gráfica da distribuição do estado clínico dos pacientes do sexo masculino com infecção urinária.	30
Figura 12 - Representação gráfica da distribuição do estado clínico dos pacientes do sexo feminino com infecção urinária.	30
Figura 13 - Representação gráfica da distribuição do estado clínico das pacientes com candidose vulvovaginal.	31
Figura 14 - Representação gráfica da distribuição das estirpes em isolados das uroculturas provenientes de pacientes do sexo masculino.	31
Figura 15 - Representação gráfica da distribuição das estirpes em isolados de uroculturas provenientes de utentes do sexo feminino.	32
Figura 16 - Representação gráfica da distribuição das estirpes em isolados de exsudado vaginal.	32
Figura 17 - Formação de biofilmes das leveduras das uroculturas provenientes de utentes do sexo masculino a 37°C após as 24h de incubação com a absorvância a 590nm, e respetivo desvio-padrão. Valores de $p < 0,05$, sendo considerados estatisticamente significativos.	34
Figura 18 - Formação de biofilmes das leveduras das uroculturas provenientes de utentes do sexo feminino a 37°C após 24h de incubação com a absorvância a 590nm, e	

respetivo erro padrão. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.	34
Figura 19 - Formação de biofilmes das leveduras de isolados de exsudado vaginal a 37°C após 24h de incubação com a absorvância a 590nm, e respetivo erro padrão. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.	35
Figura 20 - Formação de biofilmes das leveduras dos isolados de utentes grávidas a 37°C após 24h de incubação com a absorvância a 590nm, e respetivo erro padrão. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.	35
Figura 21 – Imagens de biofilmes formados pelas leveduras de quatro isolados de uroculturas de pacientes do sexo masculino, obtidos pelo microscópio invertido com ampliação 40x, 100x e 200x. (a) Biofilme formado pela <i>C. albicans</i> isolada da urolcultura 15; (b) Biofilme formado pela <i>C. parapsilosis</i> isolada da urolcultura 27; (c) Biofilme formado pela <i>C. guilliermondii</i> isolada da urolcultura 23 e (d) Biofilme formado pela <i>C. ciferrii</i> isolada da urolcultura 31.....	37
Figura 22 - Imagens de biofilmes formados pelas leveduras de 3 isolados de uroculturas provenientes de utentes do sexo feminino, obtidas pelo microscópio invertido com ampliação 40x e 100x. (a) Biofilme formado pela <i>C. albicans</i> isolada da urolcultura 3; (b) Biofilme formado pela <i>C. parapsilosis</i> isolada da urolcultura 22 e (c) Biofilme formado pela <i>N. glabratus</i> isolada da urolcultura 21.....	37
Figura 23 - Imagens de biofilmes formados pelas leveduras obtidas do exsudado vaginal, obtidas pelo microscópio invertido com ampliação 40x, 100x e 200x. (a) Biofilme formado pela <i>C. albicans</i> isolada da urolcultura 20; (b) Biofilme formado pela <i>C. parapsilosis</i> isolada da urolcultura 10 e (c) Biofilme formado pela <i>N. glabratus</i> isolada da urolcultura 13.....	38
Figura 24 - Representação gráfica do número de Unidades Formadoras de Colónias/mL recuperado para cada isolado, após a adesão nas células HeLa.....	42
Figura 25 – Imagens microscópicas da infeção por <i>C. albicans</i> nas células HeLa, obtidas com ampliação 400x e 630x. (a) Controlo negativo; (b) Isolado de urocultura provenientes de um utente do sexo masculino; (c) Isolado de urocultura proveniente de utentes do sexo feminino e (d) Isolado de exsudado vaginal.	43

Folha em branco

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Fatores de risco associadas às ITUs.	2
Tabela 2 - Fatores intrínsecos e extrínsecos que induzem o aparecimento de infecções vaginais.	3
Tabela 3 - Lista do material utilizado ao longo do estudo.	15
Tabela 4 - Lista dos reagentes utilizados ao longo do estudo.	16
Tabela 5 - Constituição do meio DMEMF-12.	21
Tabela 6 - Distribuição dos isolados de uroculturas e a respetiva percentagem da origem nos serviços hospitalares.	25
Tabela 7 - Dados de casos clínicos de uroculturas provenientes de utentes do sexo masculino com a presença de leveduras.	26
Tabela 8 – Dados de casos clínicos de uroculturas provenientes de utentes do sexo feminino com a presença de leveduras (as linhas sombreadas correspondem aos mesmos pacientes).....	26
Tabela 9 - Dados dos casos clínicos de candidose vulvovaginal (as linhas sombreadas correspondem ao mesmo paciente).	27
Tabela 10 - As concentrações mínimas inibitórias de todas as leveduras obtidas dos isolados de urina para o fluconazol ($\mu\text{g/ml}$).	33
Tabela 11 - As concentrações mínimas inibitórias de todas as leveduras obtidas dos isolados de urina para o clotrimazol ($\mu\text{g/ml}$).	33
Tabela 12 - As concentrações inibitórias mínimas dos isolados da vagina para fluconazol e clotrimazol ($\mu\text{g/ml}$).	33
Tabela 13 – Média do número total de hifas e a respetiva percentagem da capacidade de formação de tubo germinativo da <i>C. albicans</i> de utentes masculinos.	39
Tabela 14 – Média do número total de hifas e a respetiva percentagem da capacidade de formação de tubo germinativo da <i>C. albicans</i> isolada de utentes femininas com infecção urinária.	39
Tabela 15 – Média do número total de hifas e a respetiva percentagem da capacidade de formação de tubo germinativo da <i>C. albicans</i> de pacientes com candidose vulvovaginal.	40
Tabela 16 - Distribuição de isolados pela respetiva percentagem de formação de tubo germinativo da <i>C. albicans</i>	40
Tabela 17 – Média de UCF/mL e a respetiva percentagem de cada isolado que aderiu às células HeLa, comparando com o número inicial de UFC/mL.	41

Folha em branco

Lista de Acrónimos

ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CHUCB	Centro Hospitalar Universitário da Cova da Beira
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CNA	<i>Candida Não Albicans</i>
CU	Candidose Urinária
CV	Candidose Vaginal
DMEMF-12	Dulbecco's Modified Eagle Medium Mixture F-12
FBS	Soro Fetal Bovino
ITU	Infeção do Trato Urinário
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Phosphate Buffered Saline
RCF	Força Centrifuga Reativa
RPM	Rotações Por Minuto
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute medium 1640
SDA	Sabouraud-Dextrose Agar
Spp.	Espécies
TU	Trato Urinário
UFC	Unidades Formadoras de Colónias
YPD	Yeast Peptone Dextrose

Folha em branco

Comunicações Científicas

Comunicação em póster

Castro F.O., Bastos F., Fernandes M.Z., Oliveira J.M., Oliveira A.P., Ferrão A.R., Pestana P.G., Rolo J., “Unequal distribution of antifungal susceptibility among *Candida* spp. isolates of the female genitourinary tract”. Congress of Biotechnology and Microbiology 2023, Covilhã, Portugal – 7 a 9 de dezembro de 2023.

Comunicação Oral

Castro F.O., Fernandes M.Z., Oliveira J.M., Oliveira A., Oliveira A.P., Ferrão A.R., Pestana P.G., Rolo J., “A portrait of the virulence potential of *Candida* colonization: a comparative study of isolates from different human infection niches”. XIX Annual CICS-UBI Symposium, Covilhã, Portugal – 16 e 17 de julho 2024.

Castro F.O., Bastos F., Fernandes M.Z., Oliveira J.M., Oliveira A.P., Ferrão A.R., Pestana P.G., Rolo J., “Assessment of the virulent potential of yeasts isolated from urine and, in women, comparing to vaginal ones”, XXVII World Congress and International Vulvovaginal Disease Update. Ljubljana, Eslovénia – 13 a 18 de setembro 2024

Castro F.O., Oliveira J.M., Oliveira A., Oliveira A.P., Ferrão A.R., Pestana P.G., Rolo J., “Assessment of the pathogenic potential of yeasts isolated from urine”, XXII Jornadas de Biologia de Leveduras, Coimbra, Portugal – 20 e 21 de setembro 2024

Folha em branco

1. Introdução

A microbiota humana é constituída por vários microrganismos, que colonizam vários nichos, tais como o trato gastrointestinal, trato genital, trato urinário, pele, boca, entre outros. Portanto, alguns dos microrganismos desempenham funções cruciais na manutenção da saúde do hospedeiro, estabelecendo uma relação simbiótica benéfica que garante a sua sobrevivência, e, em contrapartida, protegem o hospedeiro contra os microrganismos mais patogênicos [1]. Por isso, as alterações na microbiota estão associadas a uma variedade de condições de saúde, incluindo doenças autoimunes, distúrbios gastrointestinais, obesidade, diabetes e doenças inflamatórias [2]. Contudo, a microbiota varia entre indivíduos, até mesmo os que vivem na mesma região geográfica, sendo os imunocomprometidos, o grupo mais afetado por infecções fúngicas devido ao desequilíbrio da microbiota [3]

As infecções fúngicas são uma preocupação na saúde pública a nível mundial. As pessoas com condições de saúde subjacentes ou com um sistema imunitário enfraquecido, tal como doenças crônicas, histórico de tuberculose, infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH), cancro e diabetes mellitus são um grupo vulnerável de contágio de infecção fúngica nosocomial [3, 4].

As infecções nosocomiais, também conhecidas como infecções hospitalares, são infecções adquiridas pelo paciente durante o tratamento, por isso não se manifestam antes das 48 horas após a admissão hospitalar. Geralmente, estes tipos de infecções são causadas por patógenos bacterianos, virais ou fúngicos, onde os tipos mais comuns incluem as infecções do trato urinário associadas ao uso de cateter. Desta forma, os pacientes internados em unidades de cuidados intensivos, que passam por procedimentos médicos mais invasivos e recebem antibióticos de largo espectro, bem como aqueles que tomam medicamentos imunossupressores, também enfrentam um grande risco de contrair este tipo de infecções. [3, 4, 5] Os casos de infecção fúngica estão a aumentar à medida que a população mais vulnerável continua a expandir. [5, 6]

De acordo com a OMS, a ameaça global crescente de infecções fúngicas é agravada pela resistência aos antifúngicos e pela falta de tratamentos eficazes o que prolonga os internamentos hospitalares. Por sua vez, aumenta a necessidade de medicamentos antifúngicos mais caros e, muitas das vezes, mais tóxicos, gerando implicações significativas para a saúde humana. [7] Contudo as mortes por doenças fúngicas que têm vindo a aumentar podem ser “cinco a seis vezes superiores às realmente relatadas e podem gerar um encargo económico de 24,3 mil milhões de dólares” [8]

Dos agentes microbianos associados a este tipo de infecção destaca-se a *Candida spp.* e a *Nakaseomyces glabratus*. Em particular, a *Candida albicans* encontra-se no grupo de risco crítico, seguido pela *Candida parapsilosis* e *Nakaseomyces glabratus* num grupo de alta prioridade. [7]

1.1. Microbiota urinário

O trato urinário abrange o rim, uréter, bexiga e uretra, ou seja, todo o sistema envolvido na produção, transporte, armazenamento e excreção da urina. Contudo, os órgãos reprodutores também podem contribuir para a constituição microbiana, como a vagina, colo do útero, pênis e a superfície da pele pubiana [9]. Inicialmente, acreditava-se que a urina era estéril, mas após alguns estudos, apercebeu-se através do trato urinário de indivíduos saudáveis, que a urina abriga uma vasta comunidade microbiana [10].

Entretanto, a quantidade de microrganismos em indivíduos saudáveis, é geralmente baixa, sendo o suficiente para considerar a urina estéril em testes laboratoriais de padrão [9, 10]. No entanto, quando ocorre um desequilíbrio na microbiota, dá-se uma infecção do trato urinário. Isto pode resultar em sintomas como dor ao urinar, maior frequência em urinar, dor abdominal e mal-estar geral [11]. Nestas situações, o tratamento médico geralmente é necessário para eliminar a infecção e restaurar o equilíbrio da microbiota urinária.

Estima-se que anualmente, cerca de 150 milhões de pessoas são afetadas com ITUs, sendo que uma em cada cinco mulheres adultas tem pelo menos um episódio ao longo da vida [12]. Um estudo evidencia que mais de 100 espécies de múltiplos géneros residem no trato urinário humano [9]. Entretanto, a composição da microbiota do trato urinário varia de pessoa para pessoa e pode ser influenciada por uma variedade de fatores de risco, demonstrados na Tabela 1 [13, 14].

Tabela 1 - Fatores de risco associadas às ITUs.

Diabetes mellitus;	Cancro;
Cateteres urinários;	Transplante renal;
Imunossupressão;	Sexo feminino;
Internamento nos cuidados intensivos;	Hábitos de higiene inadequados;
Cirurgia no trato urinário;	Gravidez;
Idade avançada (> 60);	Doenças sexualmente transmissíveis;
Uropatia obstrutiva;	

As ITUs podem afetar tanto homens quanto mulheres, mas existem algumas diferenças significativas em relação à incidência, sintomas e fatores de risco. As mulheres têm uma incidência superior em relação aos homens, e isso ocorre em parte devido à anatomia feminina, pois a uretra é mais curta e mais próxima do ânus, o que facilita a entrada de microrganismos na bexiga [10]. Contrariamente, os homens têm a uretra mais longa, o que pode proteger contra infecções do trato urinário, e para além disso, a presença da próstata também influencia devido à secreção de fluidos que podem ajudar a proteger contra as infecções [9]. Em consequência, pode resultar numa maior incidência de infecções urinárias assintomáticas, pois os homens podem ser menos propensos a desenvolver sintomas evidentes da infecção. Isto implica que, na maioria dos casos o homem é portador de microrganismos patogénicos, que posteriormente, se manifestam

na parceira como infecção urinária, ou até mesmo, como infecção vaginal. A maioria das infecções urinárias assintomáticas são descobertas durante os exames médicos de rotina, mas não são tratadas com antimicrobianos [14].

Embora, as ITUs causadas por fungos tenham ganho mais destaque na investigação, o papel desta comunidade microbiana na saúde ainda não é totalmente compreendido. Porém, as leveduras mais comuns encontradas no microbiota urinário tanto no homem como na mulher incluem *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *N. glabratus*, *C. guilliermondii*, *C. kefir*, *C. lusitanae* e *Candida dubliniensis* [15].

1.2. Microbiota vaginal

A microbiota vaginal é constituída por uma comunidade de microrganismos que habitam naturalmente na vagina e desempenham papéis importantes mantendo o equilíbrio da saúde vaginal [16, 17]. Vários estudos demonstraram, que a microbiota vaginal de mulheres saudáveis é essencialmente constituída por lactobacilos, sendo cruciais para a síntese de ácido lático e outros compostos que mantém um pH ácido na vagina. Este pH ácido cria um ambiente desfavorável impedindo a proliferação de patógenos associados a doenças inflamatórias pélvicas, candidose, infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) e papilomavírus humano [17, 18]. Caso contrário, cria-se um ambiente propício para uma disbiose vaginal.

Há diversos fatores que podem induzir o aparecimento das infecções vaginais, quer sejam fatores intrínsecos quer sejam extrínsecos, referidos na Tabela 2 [19].

Tabela 2 - Fatores intrínsecos e extrínsecos que induzem o aparecimento de infecções vaginais.

Fatores intrínsecos	Fatores extrínsecos
Gravidez;	Atividade sexual;
Diabetes mellitus;	Hábitos de higiene inadequados;
Polimorfismos genéticos;	Uso de contraceptivos;
Libertação de estrogénios;	Alergias;
Terapia de reposição hormonal	Uso de roupa interior de nylon apertada;

Para além disso, as grávidas são um grupo de risco, pois a gravidez é uma condição que contribui para a variabilidade da flora vaginal devido às adaptações fisiológicas que ocorrem durante o desenvolvimento do feto [18, 19]. Deste modo, o estudo de Mtibaa demonstrou que a incidência da infecção vaginal é rara antes da puberdade, sendo mais prevalente em mulheres na idade fértil, assim como em mulheres submetidas à terapia de reposição hormonal. Estas evidências podem ser explicadas através da atividade sexual ou do aumento das hormonas durante a gestação, em grávidas [20].

Entre as infecções vaginais causadas pela *Candida* spp., destaca-se a *C. albicans*, mas ultimamente têm vindo a emergir algumas espécies de *Candida* não *albicans* [16, 17, 18].

1.3. Candidose

Candida spp. faz parte flora comensal do sistema geniturinário, do trato gastrointestinal, da pele e da cavidade oral de indivíduos saudáveis. Quando se dá uma perturbação do equilíbrio normal da flora, que por sua vez, induz infecções oportunistas com causa endógena ou exógena, designa-se por candidose [8].

As lesões causadas pela doença podem variar de superficiais a crónicas envolvendo várias zonas do corpo como a boca, garganta, vagina, prepúcio, entre outras mencionadas na Figura 1. Num hospedeiro imunodeprimido há maior suscetibilidade de contrair várias infecções por *Candida* sendo ainda mais difícil de tratar ou até mesmo erradicar devido à crescente resistência aos antimicrobianos e à baixa imunogenicidade do portador [19]. Nestas situações, é crucial fazer um diagnóstico correto para uma maior eficiência terapêutica.

O diagnóstico baseia-se no exame físico e no exame laboratorial. O exame físico consiste principalmente na presença de placas brancas, erupções vermelhas/prurido/corrimento e retira-se uma amostra para que seja posteriormente reencaminhada para o laboratório [21; 22]. O exame laboratorial consiste na identificação por diferentes métodos fenotípicos que incluem o exame das suas características morfológicas e a análise da capacidade em fermentar diferentes substratos [22].

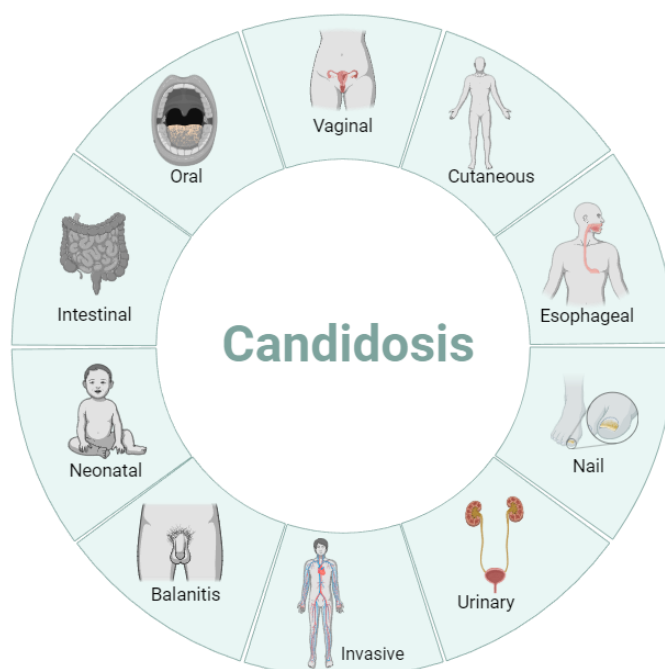


Figura 1 – Representação de alguns tipos de candidose. Imagem original criada com BioRender.com.

1.3.1. Candidose urinária

A candidúria define-se por infecção na urina causada por *Candida spp.*, sendo estes os principais agentes causadores das infecções fúngicas do trato urinário. Este tipo de infecções afeta principalmente pacientes hospitalizados, tal como foi mencionado anteriormente. [23, 24]. Alguns estudos, demonstram uma diminuição na percentagem de ITU causada por bactérias (*Escherichia coli*, *Proteus* e *Pseudomonas*) e um aumento na percentagem causada por fungos, especialmente espécies de *Candida* [4, 25].

A predisposição para ITU por *Candida* incluem idade avançada, sexo feminino, diabetes mellitus, hospitalização prolongada, entre outros mencionados na Tabela 1. Neste grupo de fatores de risco, por norma é possível corrigir os fatores subjacentes ou, remover/substituir o cateter em pacientes com cateter urinário prolongado [24].

No entanto, na atualidade não há diretrizes claramente estabelecidas para o diagnóstico de ITUs por *Candida*. Quanto ao tratamento com terapia antifúngica geralmente não é recomendada em pacientes assintomáticos, caso contrário, receita-se um antifúngico que ajuda a atingir as concentrações desejadas na urina comprovada na segunda amostra [26].

1.3.2. Candidose vulvovaginal

A candidose vaginal é a segunda causa mais comum de vaginite, sendo mais frequente em mulheres na idade reprodutiva. Atualmente, estima-se que aproximadamente 70% das mulheres na idade fértil têm pelo menos um episódio da doença e 45% sofrem de uma recorrência [21, 27, 28]. A grande maioria deste tipo de infecções são causadas pela *Candida albicans*, mas também em alguns casos é causada por espécies de *Candida* não *albicans*, especialmente a *N. glabratus* [20, 21].

Clinicamente, este tipo de infecção afeta mulheres de todas as faixas etárias, principalmente, na idade fértil, constituindo um problema na saúde pública mundial [21]. Apesar da infecção não colocar em risco a vida da mulher, causa desconforto, irritação, prurido intenso, dor e interfere com a vida sexual [21, 22, 29]. No entanto, a origem da infecção varia de mulher para mulher e o tratamento depende muito do avanço da infecção assim como o estado imunológico da portadora. Em alguns estudos, verificou-se que cerca de 20% do microbioma vaginal de grávidas e 30% em mulheres imunodeprimidas, são colonizadas por *Candida spp.*, principalmente pela *C. albicans* sendo a mais prevalente, seguida por espécies de *Candida* não *albicans*, como *N. glabratus*, e *C. parapsilosis* [22, 30].

O tratamento para a CV envolve o uso de antifúngicos, que podem ser administrados por duas vias:

Via tópica – geralmente são inseridos na vagina com um aplicador sob forma de creme, gel ou supositório vaginal. O antifúngico mais comum aplicado através desta via é o clotrimazol e não necessita de receita médica [29].

Via oral - é mais comum em casos mais graves, como a candidose vaginal recorrente em que o médico prescreve o medicamento, como por exemplo, o fluconazol [29].

Entretanto, o tratamento depende muito da gravidade da infecção e se o antifúngico é administrado numa dose única ou periódica. Para além disso, atualmente ainda estão a ser estudadas outras alternativas de tratamento mais eficazes devido ao aumento da exposição recorrente das mulheres aos antifúngicos, que posteriormente, desenvolvem resistência aos mesmos [22, 29, 30].

1.4. Leveduras da família *Debaryomycetaceae*

1.4.1. Género *Candida* spp.

O género *Candida* é um grupo diversificado com mais de 100 espécies diferentes como agentes etiológicos de infecção humana que pertencem ao reino Fungi [31, 32]. São encontradas em grande variedade de habitats, incluindo o ambiente aquático, plantas, animais e seres humanos. Portanto, as espécies de *Candida* são comensais pertencendo à microbiota da mucosa oral, trato gastrointestinal e vagina em indivíduos saudáveis. Por outro lado, são conhecidas por causar infeções oportunistas promovendo candidose invasiva, que é amplamente reconhecida como uma das principais causas de morbidade e mortalidade [31]. Por isso, é de extrema importância tratar as infeções de *Candida* no trato urinário, principalmente em doentes imunocomprometidos, podendo progredir para uma candidose invasiva. A candidose invasiva é uma doença causada por diferentes espécies de *Candida* na corrente sanguínea, e cada uma dessas espécies possui características únicas em relação ao seu potencial de invasão, virulência e suscetibilidade a antifúngicos. Entretanto, o problema clínico mais desafiador é o aumento da taxa de isolamento de *Candida* não *albicans* (*Nakaseomyces glabratus*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii* e *Candida kefyr*) e o rápido crescimento da resistência aos antifúngicos [33].

As espécies pertencentes ao reino Fungi apresentam estruturas esféricas, podendo ser unicelulares, formar pseudo-hifas (estruturas filamentosas não verdadeiras) ou hifas em certas condições ambientais. Estas estruturas podem ser observadas ao microscópio e são importantes para a patogenicidade e capacidade de formação de biofilme. Para além disso, na observação macroscópica em placas de cultura, as colónias de *Candida* spp. podem variar na cor, textura e tamanho, dependendo da espécie específica e das condições de crescimento. Geralmente, as colónias podem ser brancas ou amareladas variando no tamanho de colónias pequenas a grandes. Elas também podem ser descritas como húmidas ou secas [31, 33].

Como já referido anteriormente, a espécie mais prevalente é a *Candida albicans*, porém, nas últimas décadas, a sua dominância tem diminuído à medida que o número de infecções invasivas por espécies de *Candida* não *albicans* aumentaram [31, 32, 33].

1.4.1.1. *Candida albicans*

Candida albicans é uma levedura oportunista que faz parte do microbioma humano, e coloniza assintomaticamente, mas em casos de sistema imunológico enfraquecido, mudanças hormonais, uso frequente de antibióticos, diabetes, gravidez e certos medicamentos, como corticosteroides e contraceptivos orais, induz candidose [18, 19]. Esta espécie apresenta vários mecanismos de adaptação, podendo crescer em microambientes diferentes [34, 35, 36]. Visto que, apresenta capacidades de polimorfismo, uma transição morfológica entre a forma leveduriforme e hifa, um fator importante na sua virulência pois facilita a sua disseminação no organismo humano. Os outros fatores de virulência que podem ser citados é, a expressão de adesinas sobre a superfície em superfícies abióticas ou bióticas, a formação de biofilmes, e a secreção de enzimas hidrolíticas [34].

A transição morfológica entre leveduras e hifas permite maior interação do fungo com o hospedeiro, além disso, as etapas da morfogênese incluem a adesão, proliferação, formação de hifas, maturação do biofilme e dispersão das células. Estas transições morfológicas são fundamentais para a formação e estabilidade dos biofilmes de *Candida albicans*, contribuindo para a colonização e persistência em vários ambientes juntamente com outras espécies de fungos [35].

Em relação às infecções provocadas pela *Candida albicans* que afetam várias partes do corpo, as mais comuns é na cavidade oral, vulvovaginal, cutânea, balanoprepucial e sistêmica [36].

1.4.1.2. *Candida parapsilosis*

Candida parapsilosis é a segunda espécie do género *Candida* mais comum em isolados causadores de candidose nosocomial na Europa [37]. Apesar de ser considerada parte da população microbiana em indivíduos saudáveis, é também isolada das mãos de profissionais de saúde que são reconhecidas como um importante vetor [38].

Esta espécie apresenta várias características, algumas relacionadas com a sua virulência, sendo amplamente conhecida pela sua capacidade de adesão e formação de biofilmes em superfícies, como em cateteres venosos centrais (CVC) e noutros dispositivos clínicos [37]. Ao contrário da *C. albicans*, a *C. parapsilosis* não forma hifas verdadeiras, apenas se apresenta em fase de levedura ou pseudo-hifas. Para além disso, produz enzimas extracelulares, que expressam diferentes

fenótipos e na presença de concentrações elevadas de glucose e lípidos é capaz de proliferar, ou seja, é muito comum infecção desta espécie em diabéticos [39].

As infecções por esta levedura são prevalentes em crianças desnutridas e recém-nascidos com baixo peso à nascença e também em pacientes que foram submetidos a intervenções invasivas. Porém, as taxas de morbidade e mortalidade são altas em casos de doença invasiva [37, 40].

Entretanto, alguns estudos relatam que os isolados clínicos de *C. parapsilosis* são menos suscetíveis às equinocandinas e, em certas regiões, foi observada resistência ao tratamento com fluconazol, o que complica a escolha da terapia antifúngica [38].

1.4.1.3. *Candida guilliermondii*

Candida guilliermondii, reclassificada como *Meyerozyma guilliermondii* [41] apresenta diversas vantagens para potenciais aplicações em diversos produtos industriais devido à capacidade de secreção de proteínas com baixa modificação de glicosilação [42].

Quanto às características morfológicas, a *C. guilliermondii* é uma levedura facultativa anaeróbica com uma temperatura ótima de crescimento a 30°C, tolerando no máximo 42°C. Semelhante a outras leveduras industriais, pode ser cultivada em meios de cultura ricos em nutrientes, como o meio SDA e/ou meio YPD. Não produz hifas [42, 43].

A *C. guilliermondii* é conhecida a nível mundial por causar infecções, incluindo na corrente sanguínea (candidemia), no trato urinário e nas mucosas, sendo classificada como patogénica emergente oportunista. As infecções nosocomiais por esta estirpe estão associadas a uma taxa de mortalidade baixa, mas é descrita como tendo uma elevada resistência antifúngica ao fluconazol [44].

1.4.1.4. *Candida ciferrii*

Candida ciferrii foi descrita pela primeira vez em 1964 por Yarrow, Statzell-Tallman e Fell, em homenagem ao micologista Cesare Ciferri [J]. É um fungo ascomiceto leveduriforme, conhecido como *Stephanoascus ciferrii* ou *Trichomonascus ciferrii* [46].

Quanto às suas condições de crescimento, a *C. ciferrii* cresce em ágar Sabouraud dextrose (SDA) em diferentes temperaturas (22 °C, 27 °C e 37 °C) após uma semana e as colónias são tipicamente redondas e brancas. Ao contrário de *C. albicans*, não forma tubos germinativos a 37 °C e não fermenta galactose, lactose, maltose, sacarose e rafinose. Além disso, com base das características morfológicas e bioquímicas, a levedura pode ser erradamente identificada como outros fungos, como *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus laurentii* [46].

Inicialmente foi descoberta em isolados de origem animal, e posteriormente em 1983 foram detetados os primeiros casos em pacientes com idade avançada, mas devido às limitações que

existiam não conseguiram provar que a *C. cifferri* era a levedura patogénica [47]. Anos mais tarde, especificamente entre 2000 e 2019, a incidência do patógeno aumentou na Europa de forma preocupante, estando associada em vários casos de candidose invasiva, onicomiose, pneumonia, e entre outras [46]. Para além disso, também se verificou a presença deste fungo em pacientes imunossuprimidos e de idade avançada [48, 49, 50].

Através da análise de Berkow, cerca de 49% dos isolados apresentam resistência ao fluconazol, que por sua vez é a primeira linha de tratamento para candidose sistémica e local, e também usado para prevenir candidose invasiva nos serviços de cuidados intensivos [46, 48]. Devido a este grave problema clínico, é de extrema importância implementar tratamentos adequados para limitar a propagação de agentes patogénicos fúngicos emergentes resistentes a medicamentos.

1.5. Leveduras da família *Saccharomycetaceae*

1.5.1.1. *Nakaseomyces glabratus*

Nakaseomyces glabratus, conhecida como *Candida glabrata*, pertence à família *Saccharomycetaceae*, mas devido a diferenças filogenéticas com a *Candida* spp. foi reclassificado no género *Nakaseomyces*. Para além disso, é morfologicamente idêntica com a *Saccharomyces cerevisiae*, ao contrário das outras espécies de *Candida* [51].

Esta levedura unicelular, relativamente às outras leveduras do género *Candida*, não é dimórfica e cresce como blastósporo. Quando observada em microscópio apresenta, uma estrutura oval e não forma hifas, mas em certas condições de crescimento tem capacidade de formar pseudo-hifas. Quanto ao seu meio de crescimento, a *N. glabratus* cresce em meio SDA a 37°C e apresenta colónias homogêneas de cor branca com uma textura cremosa, como qualquer espécie de *Candida*. Em CHROMágar, as colónias aparentam ser rosa ou roxo. Relativamente ao metabolismo, esta espécie tem a capacidade de realizar fermentação da glicose, produzindo álcool etílico e CO₂ como produtos finais, e ainda metaboliza outros açúcares, como a maltose e sacarose [52].

Entretanto, a *N. glabratus* ganhou destaque na investigação porque inicialmente não era considerada como um ser patogénico oportunista, mas sim um microrganismo comensal pertencente à flora de indivíduos saudáveis, sobretudo ao microbioma gastrointestinal [53]. Porém, nas últimas décadas tem sido a causa de múltiplas infeções em vários países, sobretudo em ambientes hospitalares. Entre as infeções fúngicas, está a candidose invasiva, que por sua vez, encontra-se associada a uma alta taxa de mortalidade [54]. Este tipo de infeção, ocorre predominantemente em pacientes com o estado mais grave do sistema imunológico comprometido, tal como, em pacientes transplantados, idosos, pacientes expostos ao largo

espectro de antibióticos, entre outros. Para além disso, é o segundo agente causador de infecções vulvovaginais em todo mundo [53].

Um dos fatores que contribuem para a alta disseminação da levedura, deve-se à resistência aos antifúngicos, principalmente aos azóis, o que torna difícil o combate. Contudo, esta resistência pode ser adquirida devido ao elevado uso de antimicrobianos nos tratamentos, especialmente o fluconazol, que é frequentemente usado no tratamento de infecções fúngicas [55]. Para além da resistência aos antifúngicos, a *N. glabratus* forma biofilmes conferindo fácil adaptação em diferentes habitats, aumentando a dificuldade no tratamento das infecções [54].

1.6. Fatores de virulência

Os fatores de virulência são características que os microrganismos possuem, tal como, as espécies de *Candida*, e confere-lhes capacidades de induzir lesões nos tecidos causando doenças. Mas para que a infecção ocorra, as leveduras têm de conseguir invadir e colonizar superfícies bióticas (células do hospedeiro) e/ou abióticas (implantes, cateteres e outros dispositivos médicos), sobreviver e disseminar novos tecidos ou órgãos [19]. Entre os fatores de virulência, destaca-se a capacidade de adesão e formação de biofilme, e a capacidade de produzir formas filamentosas que facilitam a invasão do tecido hospedeiro [19, 56]. Entretanto, a patogenicidade do agente depende dos fatores de virulência que possui. Por exemplo, *C. albicans* tem a capacidade de aderir através de adesinas e formar biofilmes, assim como a *N. glabratus*, mas para além disso, ainda consegue formar estruturas filamentosas o que confere maior grau de patogenicidade [57]. Em estudos in vivo com modelos de animais com infecção fúngica, confirma-se que a *C. albicans* é a levedura mais patogénica, assim como, em estudos in vitro demonstram que é a espécie que mais fatores de virulência expressos comparativamente às outras espécies mencionadas na secção 1.4. [56, 58].

Portanto os fatores de virulência mencionados anteriormente, faz com que os patógenos fúngicos referidos anteriormente sejam de difícil tratamento, e por sua vez, estão associados a altas taxas de morbidade e mortalidade [59].

1.6.1. Adesão e formação de biofilmes

O crescimento e a disseminação das leveduras é determinada pela adesão e formação de biofilmes. A adesão é uma etapa fundamental para garantir a sobrevivência do agente patogénico no hospedeiro.

A capacidade de adesão das leveduras, dá-se através das interações físicas e químicas, como as forças de Van der Waals, as interações hidrofóbicas e as ligações iónicas. Nos tecidos, as células fúngicas estabelecem ligações com os recetores específicos (fibrinogénio, fibronectina e laminina) do hospedeiro através das adesinas. A importância da capacidade do fungo em aderir às células, tecidos ou outros tipos de superfícies expostas à circulação de fluidos, é um pré-requisito para a colonização e a subsequente infeção [60, 61].

De seguida, verifica-se a proliferação e maturação do biofilme. As células microbianas encontram-se organizadas em biofilmes, e raramente são encontradas como células individuais no seu microambiente. Porém, a formação de biofilmes das leveduras depende do tipo de material em que está em contacto, bem como, da espécie envolvida. Cada espécie apresenta peculiaridades significativas em termos de formação de biofilme, o que resulta em diferentes morfologias, composição da matriz extracelular e resiliência aos agentes antifúngicos [62].

Os biofilmes são um grupo de microrganismos dinâmicos, envolvidos por uma camada heterogénea, definida como matriz do biofilme. Esta matriz é composta por carboidratos, proteínas, glicose, fósforo, entre outros. Para além disso, contribui para a proteção e tolerância aos microrganismos contra os agentes antifúngicos, pois a matriz pode agir como uma barreira impedindo que haja passagem destas substâncias. No entanto, o crescimento dos biofilmes é limitado pela temperatura, existência de nutrientes no meio ambiente e pela difusão destes mesmos na matriz. Dentro deste grupo, existem biofilmes que podem ser compostos por uma única espécie ou várias espécies, sendo designados por biofilmes polimicrobianos. Quando se trata de biofilmes polimicrobianos, os microrganismos podem estabelecer relações sinérgicas ou relações antagonistas, onde se podem beneficiar mutuamente ou competir entre si por nutrientes produzindo compostos que inibem o crescimento de outros microrganismos residentes [60].

A formação de biofilmes das espécies mencionadas na secção 1.4. é dividida em 3 fases: numa fase inicial em que o biofilme ainda está a se formar (0-6 horas), fase intermediária (7-12 horas) e por fim, a fase madura (13-48 horas). Após as 48h da formação do biofilme, inicia-se a disseminação das células fúngicas originando infeções graves e persistentes, o que agrava a situação dos pacientes já internados [63].

De acordo com o National Institutes of Health (NIH), estima-se que mais de 65% de todas as infeções microbianas em humanos estão associadas a biofilmes [64]. Em casos de infeções recorrentes, a eliminação dos biofilmes necessita da administração de doses elevadas de

antifúngicos, e/ou até mesmo a remoção do dispositivo médico causador da infecção, que posteriormente origina complicações significativas pondo em causa a vida do paciente [63].

1.6.2. Tubo germinativo

As hifas desempenham um papel crucial na invasão de tecidos, pelo que a *C. albicans* tem a capacidade de apresentar, na forma leveduriforme, pseudo-hifa e hifa. Por outro lado, as espécies de *Candida não albicans* não produzem tubo germinativo da mesma forma.

Entre a fase de leveduras e a formação de hifas existe um estado de transição, os tubos germinativos, com capacidade de escapar à fagocitose dos macrófagos, resultando numa maior probabilidade de invadir os tecidos do hospedeiro e causar mais lesões [65].

Entretanto a forma leveduriforme, pseudo-hifas e hifas diferem nas funções e morfologia celular. Em relação às leveduras, cuja função principal é a disseminação, são unicelulares e reproduzem-se assexuadamente por gemulação. As células pseudo-hifas facilitam a adesão e invasão inicial, têm formas multicelulares longas, variando na largura e comprimento, sendo parcialmente idênticas às hifas. Por último, as hifas são multicelulares em forma de túbulos e desenvolvem-se a partir de uma célula de levedura não germinada. Posto isto, as hifas são cruciais na invasão de tecidos, formação de biofilmes e evasão de respostas imunes, contribuindo para a virulência da *C. albicans* [66].

Vários estudos mencionam que a *Candida albicans* sem a formação de tubos germinativos, apresenta menor capacidade de invasão de tecidos comparativamente com hifas do tipo selvagem [65]. Deste modo, verifica-se que o aumento da taxa de candidose em pacientes imunocomprometidos durante o período de internamento nos cuidados intensivos está associado à presença de hifas nos dispositivos médicos [65, 66].

2. Objetivo

A realização deste trabalho tem como objetivo principal estudar a relação entre os quadros clínicos de infecções vulvovaginais por *Candida* spp. e as infecções urinárias causadas por fungos. Assim como, compreender os mecanismos de virulência e adaptação ao hospedeiro dos fungos colonizadores e a sua relação entre o micobiota vaginal e urinária.

Para realização deste objetivo em específico, pretende-se:

1. Estudar a distribuição das espécies de *Candida* presentes na colonização do trato urinário e vulvovaginal;
2. Estudar a resistência aos antifúngicos de compostos azólicos (fluconazol e clotrimazol) através da avaliação da concentração mínima inibitória (CMI) do método da microdiluição em placa;
3. Caracterizar os isolados quanto à capacidade de expressão de fatores de virulência para estabelecer infecção, tais como a:
 - a. Formação de Biofilme;
 - b. Formação do tubo germinativo da *C. albicans*;
 - c. Adesão in-vitro de isolados urinários e vaginais de *C. albicans* a uma linha celular cervical (HeLa).

Secundariamente, procurou-se conhecer as características clínicas, demográficas e microbiológicas dos doentes que realizaram colheitas para uma análise comparativa destas infecções, nomeadamente a faixa etária, sexo, diabetes, gravidez, data da colheita e identificação da estirpe.

Folha em branco

3. Materiais e métodos

3.1. População em estudo

Consideraram-se dois grupos de estudo: o grupo de pacientes diagnosticados com infeção urinária, dos quais foram recolhidas uroculturas entre dezembro de 2022 a junho de 2023 e o grupo de pacientes diagnosticados com Candidose Vulvovaginal (CVV) das quais foram recolhidas zaragatoas da vagina pelo prof. Doutor José Martinez de Oliveira entre janeiro de 2021 a agosto de 2022.

As amostras provenientes de zaragatoa do exsudado vaginal foram requisitadas pelo consultório privado de ginecologia, no auxílio do diagnóstico clínico, que correspondeu a 25 isolados. Após a recolha, as leveduras obtidas das zaragatoas foram isoladas em meio SDA. As colónias típicas de *Candida* spp foram repicadas para SDA, e após crescimento, criopreservadas em BHI-glicerol a -80°C. A identificação da espécie foi realizada recorrendo à análise automatizada de 46 reações bioquímicas (VITEK, BioMerieux), em colaboração com o Serviço de Patologia Clínica do CHUCB. Por outro lado, as amostras provenientes de uroculturas foram identificadas através de testes bioquímicos realizados pelo sistema VITEK, tendo sido requisitadas em contexto de urgência, consulta externa ou internamento do CHUCB, que correspondeu a 37 isolados (17 de pacientes do sexo masculino e 20 de pacientes do sexo feminino).

3.2. Recolha de dados

Os dados relativos aos isolados de uroculturas foram fornecidos através da consulta dos processos clínicos no CHUCB pelas coorientadoras prof Doutora Paula Pestana e Rita Ferrão. Os dados relativos aos isolados provenientes dos exsudados vaginais foram fornecidos pelo Prof. José Martinez de Oliveira. Após concluir este processo, foi criada uma base de dados de forma anonimizada utilizando o programa Microsoft Excel onde posteriormente, foram analisados os dados, assegurando assim a confidencialidade e a proteção de informações dos pacientes.

Os grupos em estudo foram caracterizados tendo em conta a origem da amostra (internamento, consulta, urgência), faixa etária, género, diabetes mellitus, gravidez e por fim, a identificação da estirpe.

3.3. Materiais e reagentes

Tabela 3 - Lista do material utilizado ao longo do estudo.

Material	Origem
Incubadora 37°C	Binder, Dias de Sousa S.A., Portugal
Densitómetro	Grant- bio, Grant Instruments, Fisher Scientific, New Jersey
Leitor de microplacas	Bio-Rad, Estados Unidos da América

Agitador orbital	Aralab Agitorb 200, Lisboa, Portugal
Minispin	MiniSpin Eppendorf, Alemanha
Microscópio ótico	Nikon YS100, Japão
Camara de Neubauer	OptikLabor, Alemanha
Vórtex	Labnet international, Estados Unidos da América
Eléctrodo de pH	Crison, Espanha
Balança	RADWAG, AS160/C/2, Polónia
Microscópio ótico invertido	Olympus IX51, Thermo Fisher Scientific, Estudos Unidos da América
Contador de colónias	Colony Counter Digital, Selecta S.A., Espanha
Microscópio de fluorescência	Axio Imager A1, Carl Zeiss, Alemanha

Tabela 4 - Lista dos reagentes utilizados ao longo do estudo.

Reagentes	Origem
RPMI-1640	Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América
Meio SDA	VWR Avantor, Estados Unidos da América
Meio YPD	Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos da América
Meio BHI	VWR Avantor, Bélgica
Meio DMEMF-12	Thermo Fisher Scientific, Gibcon, Reino Unido
Tampão MOPS	Thermo Fisher Scientific, Bélgica
FBS	Biochrom, mbH, Berlim, Alemanha
PBS 1x	Na ₂ HPO ₄ , Fisher Scientific, Estados Unidos da América; 20 mM KH ₂ PO ₄
Cristal violeta a 0,05%	VWR, Avantor, Estados Unidos da América
Acido acético a 33%	Fisher chemical, Estados Unidos da América
Metanol	Fisher chemical, Estados Unidos da América
NaCl	Sigma-aldrich, Estados Unidos da América
Fluconazol (C ₁₃ H ₁₂ F ₂ N ₆ O)	Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos da América
Clotrimazol (C ₂₂ H ₁₇ ClN ₂)	Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América
Penicilina	Sigma- Aldrich®, Portugal
Estreptomina	Sigma- Aldrich®, Portugal

3.4. Pré-inoculo das leveduras

Para a realização dos ensaios, os microrganismos são repicados no dia anterior em placas de SDA, que posteriormente são incubadas durante 24 horas a 37°C para permitir o seu crescimento.

3.5. Avaliação da suscetibilidade antifúngica

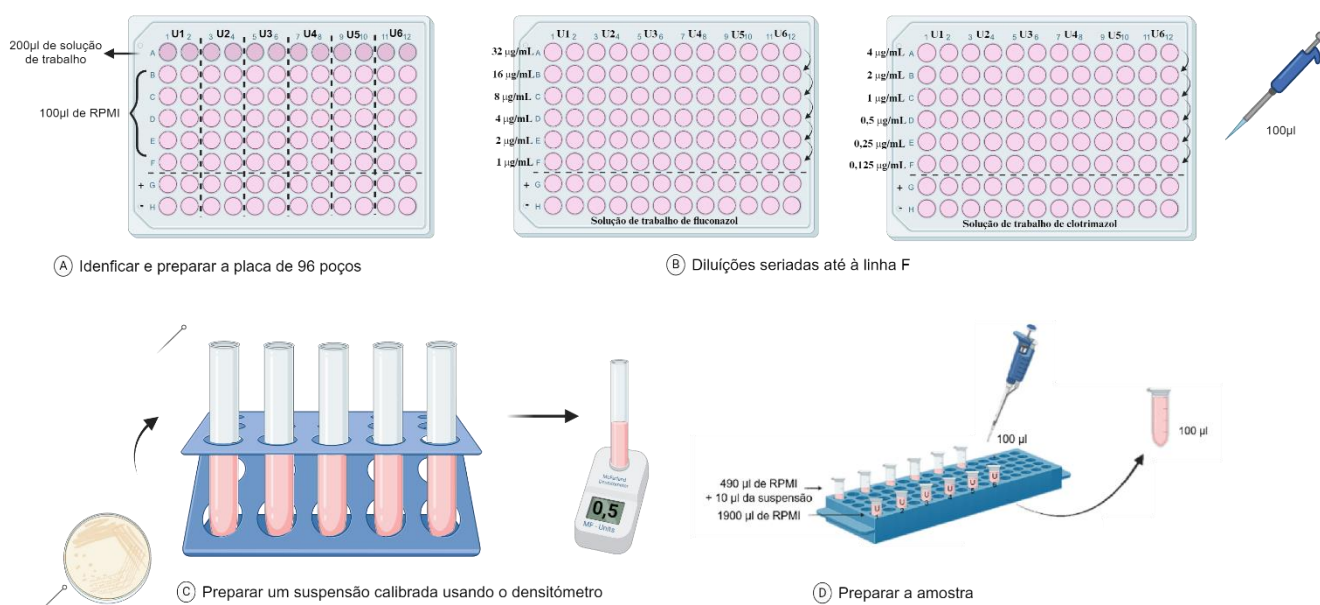
A atividade antimicrobiana de todos os isolados, tanto as uroculturas como as de exsudado vaginal, foi determinada através da concentração mínima inibitória (CMI), segundo as normas do método de referência para testes de diluição em caldo com o objetivo de determinar a "sensibilidade à terapia antifúngica dos fungos".

Para a realização do procedimento, foram feitos 2 ensaios independentes em duplicado. As culturas foram pré-inoculadas no dia anterior. De seguida começou-se a preparar a solução de stock (que posteriormente é armazenada para uma futura utilização) e a solução de trabalho:

- Solução de Stock = 1,28 mg de antifúngico em 1 ml de H₂O;
- Solução de trabalho de fluconazol = 100µl de solução de stock + 900µl de meio RPMI-1640.
- Solução de trabalho de clotrimazol = 10µl de solução de stock + 990µl de meio RPMI-1640.

Numa placa de 96 poços estéril, transferiu-se 200µl de solução de trabalho na primeira linha de poços (linha A) e nos restantes poços adicionou-se 100µl de meio RPMI-1640. Posteriormente, são feitas diluições seriadas, tal como demonstra a Figura 2.

Das placas de SDA do pré-inóculo, retirou-se duas a três colónias que foram ressuspensas no meio RPMI-1640 até uma concentração de 0.5 Macfarland (1x10⁶ células/mL), com o auxílio do densitómetro. Desta suspensão, foi preparada a suspensão de trabalho, ao diluir 10µl em 490µl de meio RPMI-1640; seguindo-se outra diluição de 100µl em 1900µl de RPMI-1640. Foram retirados 100µl da suspensão de trabalho e misturados em todos os poços até à linha F inclusive. Por último, a placa de 96 poços foi incubada a 37°C por 24h para depois serem lidas no leitor de placas com absorvância a 600nm.



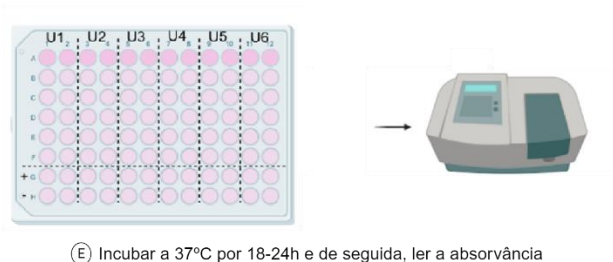


Figura 2 – Ilustração esquemática do procedimento da realização dos ensaios da atividade antimicrobiana, criada com BioRender.com.

3.6. Avaliação da capacidade de formação de biofilmes

A capacidade de formação de biofilmes foi avaliada através da quantificação da biomassa total corada com o cristal violeta. Para este procedimento foram realizados 2 ensaios independentes em quadruplicado para cada isolado, sendo que o ensaio teve a duração de 4 dias como se verifica na Figura 3.

As amostras foram pré-inoculadas, tal como foi mencionado anteriormente. De seguida, as colónias foram ressuspensas em meio YPD e incubadas por 24h num agitador orbital a 37°C a 150 RPM.

Após a incubação as células foram recolhidas por centrifugação a 13000 RPM durante 2 minutos e este processo repete-se intercaladamente duas vezes, com lavagens de 1mL de PBS estéril. As células recolhidas foram ressuspensas no meio RPMI-1640 até uma concentração de 0.5 Macfarland (1×10^6 células/mL) através do densitómetro. Desta suspensão final, pipetou-se 100µl por poço numa placa de 96 poços estéril, sendo posteriormente, incubada a 37°C por 24h.

No último dia do ensaio, retirou-se com cuidado o meio com a ponta encostada na borda do poço e efetuaram-se três lavagens com 100µl de PBS estéril para garantir que as células planctónicas foram retiradas. Adicionou-se 100µl de metanol a 99%, por 15 min com o objetivo de fixar o biofilme. Depois de ter o biofilme fixado, observou-se em microscópio invertido, recolhendo-se fotografias dos biofilmes formados em cada espécie por género. Estas imagens adquiridas foram observadas numa ampliação de 100x, 200x e 400x.

Coraram-se os biofilmes de cada poço com 100µl de cristal violeta por 15 min. Passado os 15 min, removeu-se indiretamente com cuidado o corante sob a água corrente. De seguida, o biofilme foi ressuspendido numa solução de 150µl ácido acético a 33%. Por fim, realizou-se uma diluição de 1:10, colocando-se 10µl do biofilme preparado anteriormente no respetivo poço numa nova placa de 96 poços estéril com 90µl de ácido acético.

Por último, a placa de 96 poços foi lida no leitor de placas com absorvância a 590nm.

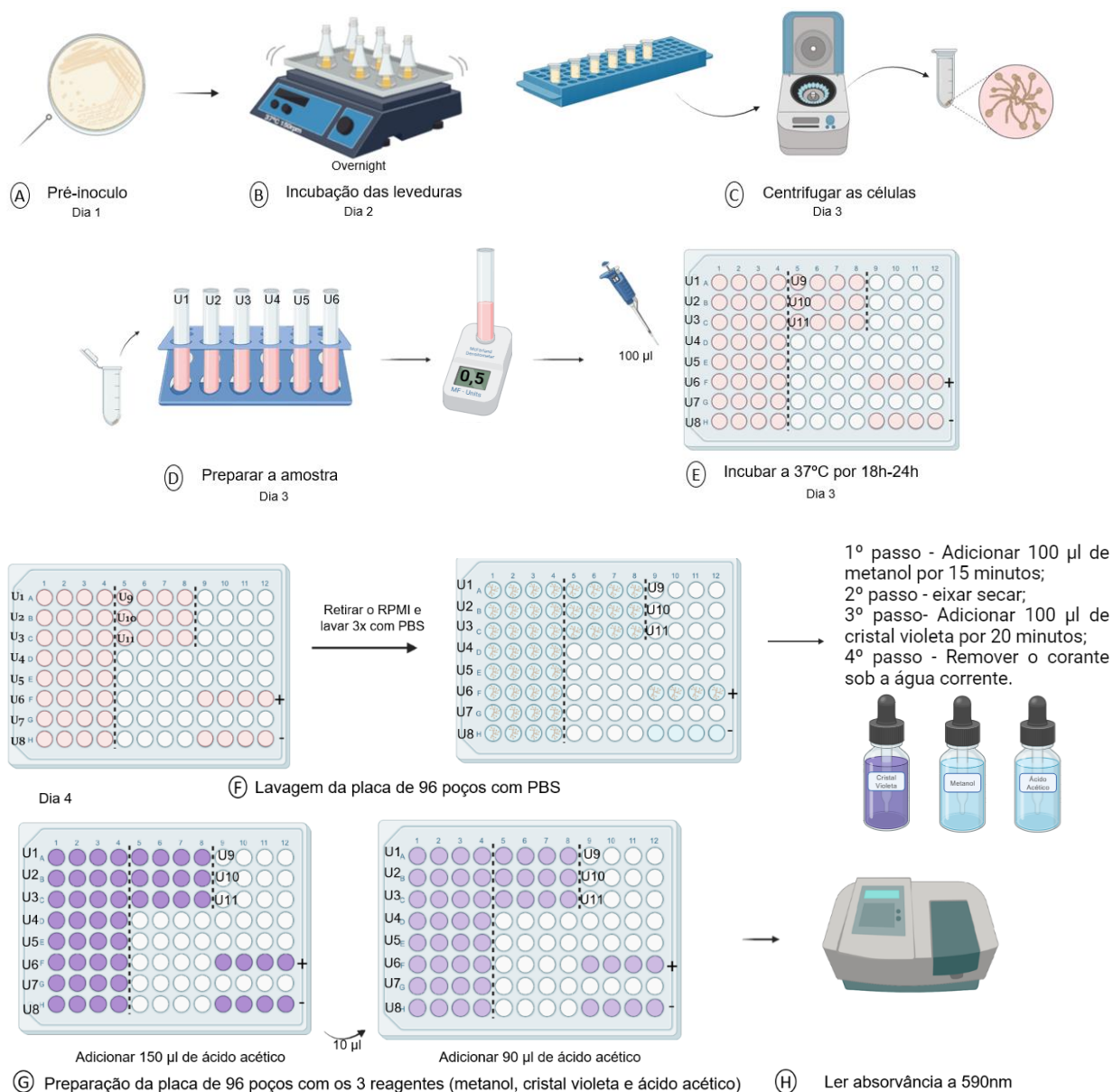


Figura 3 – Ilustração esquemática dos ensaios para a determinação da capacidade de formação de biofilmes, criada com BioRender.com.

3.7. Avaliação da capacidade de formação de tubo germinativo

Para a realização do ensaio, foram selecionados especificamente isolados *C. albicans*, quer nos isolados de uroculturas quer nos isolados de exsudado vaginal.

Inicialmente, preparou-se as suspensões de leveduras em PBS estéril, até a uma concentração de 1 Macfarland (2 milhões de células/mL). Posteriormente, transferiu-se 250µl para um preparado com 650µl de YPD e 100µl de 10% de FBS. De seguida, a cultura foi incubada a 37°C por 2h num agitador orbital com 150 RPM. Após a incubação, pipetaram-se 10µl da cultura na câmara de

Neubauer para a observação no microscópio ótico com uma ampliação de 400x no intuito de determinar a percentagem de células com tubo germinativo.

Os resultados obtidos para cada isolado foram classificados através da proporção de células com tubo germinativo do total de células existentes, como demonstra a seguinte Equação 1:

$$\% \text{ de células com tubo germinativo} = \frac{\text{Total de células}}{\text{Total de células com tubo germinativo}} \times 100 \text{ (1)}$$

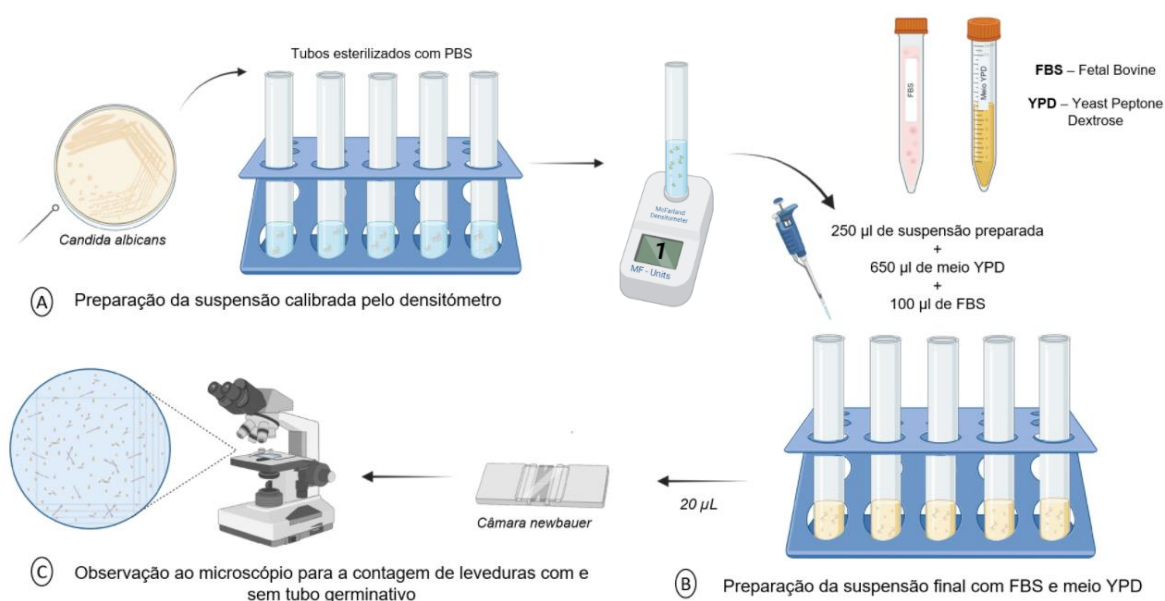


Figura 4 – Ilustração esquemática dos ensaios para a quantificação de tubos germinativos formados, criada com BioRender.com.

3.8. Avaliação da adesão nas células HeLa

Para este estudo, foram incluídas oito amostras (3 isolados provenientes de urinas de pacientes do sexo masculino, 2 isolados provenientes de urinas de pacientes do sexo feminino e 3 isolados provenientes de exsudado vaginal) de *C. albicans*. Para a realização deste procedimento, foi utilizada uma linha celular humana isolada do colo do útero com adenocarcinoma (células HeLa ATCC® CCL-2TM) [67].

Cultura de células

Primeiramente, começou-se por preparar o meio completo DMEMF-12, onde se verifica a sua constituição na Tabela 5.

Tabela 5 - Constituição do meio DMEMF-12.

Meio de cultura DMEMF-12

6 g de DMEMF-12
0,8 g de Bicarbonato de Sódio
500 mL de água pura
50 mL de FBS inativado
5 mL de Penicilina e Estreptomicina

O meio DMEMF-12 foi ajustado a um pH de 7,4 com o auxílio do eletrodo de pH, e esterilizado através do método de filtração utilizando uma unidade de filtração. Uma vez que foi esterilizado, semeou-se as células garantindo o seu crescimento a cada 48h até estarem prontas para a passagem.

Para realizar a passagem, ou seja, passar as células para um novo T-flask esterilizado com meio DMEMF-12. Em primeiro lugar, removeu-se o meio de cultura, e de seguida, submeteu-se a cultura celular à ação da tripsina, de forma a cobrir todas as células no frasco de cultura, que posteriormente, são incubadas a 37°C entre 10 a 15 min, segundo as normas do ATCC [67]. Após a incubação, adicionou-se meio para anular a ação da tripsina e a suspensão foi submetida à centrifuga (125 RCF durante 5 min) para separar as células do meio (sobrenadante). O sobrenadante (meio e restos celulares não viáveis) foi excretado e as células foram transferidas para um novo frasco de cultura adicionado com meio DMEMF-12.

Semear células numa placa de 24 poços estéril

Depois de as células estarem tratadas procedeu-se à contagem, e para isso, pipetou-se 10µl da suspensão para um Eppendorf com 10µl de azul tripano. De seguida, transferiram-se 10µl do Eppendorf para a câmara de Neubauer, e com o auxílio do microscópio ótico contaram-se o total de células nos 4 quadrantes.

Através do número total de células, calculou-se a média, multiplicando pelo fator de diluição e por 10 000 células/mL, como se verifica na seguinte Equação 2.

$$N^{\circ} \text{ de células} = \frac{n^{\circ} \text{ total de células contadas}}{n^{\circ} \text{ de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10\,000 \quad (2)$$

De seguida, calculou-se o volume inicial a pipetar através da Equação 3, para preparação da linha celular.

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2 \quad (3)$$

C₁ corresponde ao número de células calculado com a Equação 2;

V₁ corresponde ao volume que é necessário para retirar;

C_2 corresponde ao número de células pretendidas (2×10^5 células/mL);

V_2 corresponde ao volume final pretendido da suspensão no tubo (10mL).

Contudo, o valor da incógnita é o volume inicial de células a ser transferido para um novo tubo com o meio DMEMF-12. Deste modo preparou-se a linha celular, adicionando 3,3 mL de células HeLa num tubo de falcon com 6,7 mL de meio DMEMF-12. Com a linha celular preparada, semeou-se 500µl numa placa de 24 poços estéril como demonstra a Figura 5. Por fim, a placa é incubada a 37°C por 24h.

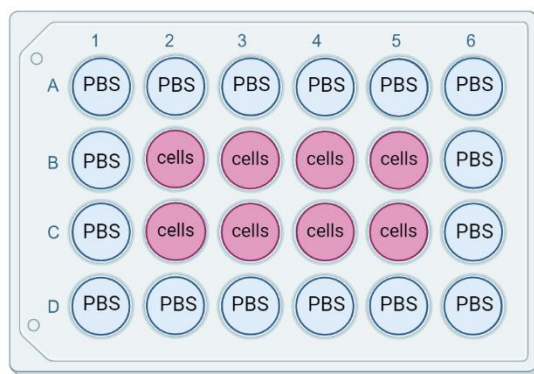


Figura 5 - Representação da placa de 24 poços com suspensão da linha celular, criada com BioRender.com.

No dia seguinte, fez-se uma suspensão em meio DMEMF-12 de 0.5 Macfarland (1 milhão de células/mL) de leveduras obtidas dos isolados selecionados com base dos resultados da avaliação da capacidade de formação de tubo germinativo.

Controlo do UCF/mL da suspensão de leveduras

Da suspensão, pipetou-se 10µl de leveduras e ressuspendeu-se numa nova placa de 96 poços com 90µl de PBS estéril, em quadruplicado. Após a ressuspensão diluíram-se seriadamente 1:10, até à diluição 10^{-4} e por sua vez, transferiram-se 5µl de cada diluição para placas de petri com meio de cultura SDA, tal como demonstra a Figura 6. De seguida, as placas de SDA foram incubadas a 37°C por 24h com o objetivo de contar as colónias formadas, e assim estimar o número de UFC/mL da suspensão infetante.

Infeção da linha celular

Da suspensão, pipetou-se 1 mL para o respetivo poço com a linha celular, em duplicado, e a placa foi incubada por 2h a 37°C. Após a incubação, foi retirado o sobrenadante. De seguida, foram efetuadas 2 lavagens com PBS 1x (1 mL), com o objetivo de remover leveduras em suspensão. As leveduras aderidas foram removidas pela adição de uma solução de 0,01% de tripsina (1 mL). De seguida, foram transferidos 10µl para os respetivos poços, numa nova placa de 96 poços estéril

com 90µl de PBS estéril, em quadruplicado. Destas placas foram feitas diluições seriadas 1:10 até à diluição 10⁻⁴, e transferiu-se 5µl com o auxílio da multicanal para uma placa de SDA, como se encontra representado na Figura 6. De seguida, foi incubada por 24h a 37°C para depois proceder à contagem das colónias dos isolados por placa de SDA.

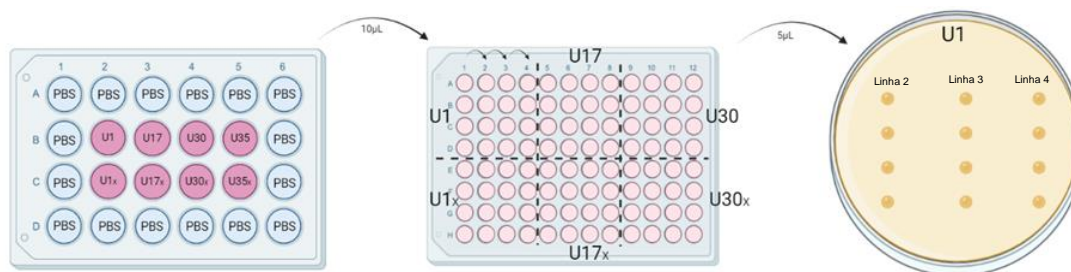


Figura 6 – Representação do esquema da infecção da linha celular com a *C. albicans* nos poços para a placa SDA, criada com BioRender.com.

Imagens por microscopia

Para obtenção de imagens por microscopia, o ensaio foi realizado como descrito anteriormente, mas recorrendo à colocação de lamelas na placa inicial, antes da sementeira com a linha celular. Na placa inicial de 24 poços com a linha celular + *C. albicans* de cada isolado, procedeu-se à coloração com hematoxilina e eosina. Em primeiro lugar, lavou-se 2 vezes com 500µl PBS estéril e depois adicionou-se 1mL de formaldeído durante 15 min, para fixar as células com o objetivo de manter a sua integridade. Em segundo lugar, foi feita intercaladamente a coloração por 1 a 2 min com a lavagem de água destilada, começando pela hematoxilina e depois a eosina. Por último, fez-se a desidratação da lamela e colocou-se na lâmina para a observação em microscópio de fluorescência com ampliação 400x e 630x.

3.9. Análise estatística

Dos ensaios da quantificação de biofilmes formados, calculou-se a média e o desvio padrão. Os ensaios foram considerados conformes quando o desvio padrão foi igual ou inferior a 25%. Através da média foram feitos os gráficos de barras com o respetivo desvio de padrão. Quanto aos ensaios da formação do tubo germinativo apenas foram validados quando se obtiveram dois ensaios, cuja diferença na formação de tubos germinativos seria inferior a 15%. Por fim, no estudo da adesão a células Hela foram realizados 4 ensaios em duplicado, e os valores de UFC/mL foram convertidos em log₁₀.

A análise estatística e os gráficos de barras foram feitos no One-way ANOVA. Os valores de p iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Os resultados foram analisados utilizando o software Graphpad Prism 8.

3.10. Considerações éticas

Para a realização deste estudo, foi obtido o parecer da comissão de ética, assim como a autorização do Presidente do Conselho de Administração e da Diretora do Serviço de Patologia Clínica e da Comissão de Ética do CHUCB [anexo I].

Folha em branco

4. Resultados

4.1. Caracterização da população em estudo

A população em estudo é constituída por 37 isolados de uroculturas de 35 pacientes, das quais 18 são do género feminino (54%) e 17 do género masculino (46%), tal como demonstra o gráfico da Figura 7. Para além disso, ainda foi obtido 25 isolados de exsudado vaginal de 20 pacientes. Entretanto, não há qualquer relação entre os pacientes de quais foram recolhidos os isolados de uroculturas e os de exsudado vaginal.

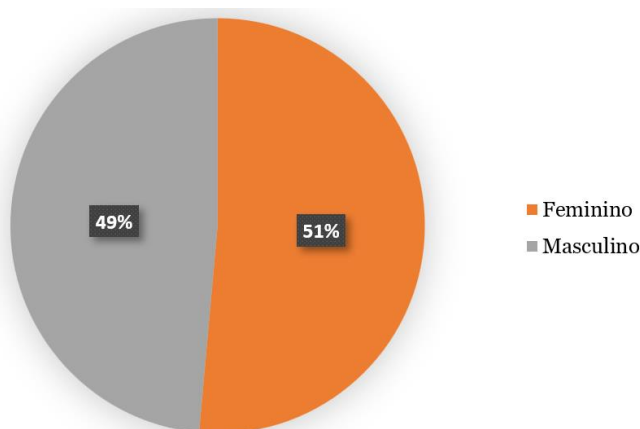


Figura 7 - Representação gráfica da distribuição dos isolados de uroculturas por género.

A grande maioria dos isolados de pacientes com infeção urinária teve origem no internamento, com cerca de 62% (n=23). Por outro lado, no serviço de consulta externa, apenas foram recolhidas 5 amostras (14%), como se verifica na Tabela 6.

Tabela 6 - Distribuição dos isolados de uroculturas e a respetiva percentagem da origem nos serviços hospitalares.

Origem	Nº de isolados	Percentagem %
Consulta externa	5	14%
Serviço de urgência	9	24%
Internamento	23	62%
Total	37	100%

Amostras urinárias provenientes de pacientes do sexo masculino

No total obteve-se 17 amostras de uroculturas provenientes de diferentes utentes do sexo masculino. Destes utentes, teve-se o conhecimento que 2 deles encontram-se imunocomprometidos.

Tabela 7 - Dados de casos clínicos de uroculturas provenientes de utentes do sexo masculino com a presença de leveduras.

Isolados	Estirpe	Idade	Diabetes mellitus	Origem
U4	<i>C. albicans</i>	83	Sim	U
U6	<i>C. albicans</i>	89	Não	I
U9	<i>C. albicans</i>	87	Não	I
U10*	<i>C. albicans</i>	41	Não	U
U12	<i>C. albicans</i>	80	Sim	I
U14	<i>C. albicans</i>	85	Não	I
U15	<i>C. albicans</i>	90	Sim	I
U16	<i>C. albicans</i>	80	Sim	I
U23	<i>C. guilliermondii</i>	57	Sim	U
U25	<i>C. albicans</i>	81	Não	I
U27	<i>C. parapsilosis</i>	81	Não	I
U30	<i>C. albicans</i>	90	Sim	I
U31	<i>C. ciferrii</i>	83	Não	C
U32	<i>C. albicans</i>	79	Não	I
U34*	<i>C. albicans</i>	41	Não	U
U35	<i>C. albicans</i>	85	Sim	I
U38	<i>C. albicans</i>	88	Não	I

*utentes imunodeprimidos

Amostras urinárias provenientes de pacientes do sexo feminino

Em relação às pacientes femininas diagnosticadas com infecção urinária, recolheu-se no total 20 isolados de 18 pacientes, as quais tivemos o conhecimento dos dados clínicos demonstrados na Tabela 8. Por isso, os isolados U7 e U11 foram recolhidos em dias diferentes da mesma paciente internada. Quanto, aos isolados U18 e U20 também são da mesma paciente que por sua vez, deu entrada no serviço de urgência.

Tabela 8 – Dados de casos clínicos de uroculturas provenientes de utentes do sexo feminino com a presença de leveduras (as linhas sombreadas correspondem aos mesmos pacientes).

Isolados	Estirpe	Idade	Diabetes mellitus	Origem
U1**	<i>C. albicans</i>	71	Sim	I
U2	<i>C. albicans</i>	91	Não	I
U3	<i>C. albicans</i>	65	Sim	I
U5	<i>C. albicans</i>	87	Sim	I
U7	<i>N. glabratus</i>	48	Sim	I
U8	<i>C. albicans</i>	83	Não	U
U11	<i>N. glabratus</i>	48	Sim	I
U13	<i>C. albicans</i>	80	Não	C

U17	<i>C. albicans</i>	89	Não	I
U18	<i>N. glabratus</i>	78	Sim	U
U19	<i>N. glabratus</i>	95	Não	U
U20	<i>N. glabratus</i>	78	Sim	U
U21	<i>N. glabratus</i>	95	Não	I
U22*	<i>C. parapsilosis</i>	28	Não	C
U24	<i>C. albicans</i>	76	Não	I
U28*	<i>C. albicans</i>	30	Não	C
U29	<i>C. albicans</i>	90	Sim	I
U33	<i>C. albicans</i>	83	Não	I
U36*	<i>C. albicans</i>	30	Não	C
U37	<i>C. albicans</i>	76	Não	U

*Utentes grávidas **Utente internada nos UCI

Amostras de exsudado vaginal

Acerca das pacientes diagnosticadas com candidose vulvovaginal, recolheu-se 25 isolados de exsudado vaginal de 21 pacientes, cujos dados clínicos encontram-se na Tabela 9. Os isolados VAG1, VAG2, VAG3, VAG4 e VAG11, recolhidos em dias diferentes, pertencem à mesma paciente que foi diagnosticada com candidose vulvovaginal recorrente.

Tabela 9 - Dados dos casos clínicos de candidose vulvovaginal (as linhas sombreadas correspondem ao mesmo paciente).

Isolados	Estirpe	Idade	Diabetes mellitus
VAG1	<i>N. glabratus</i>	64	Não
VAG2			
VAG3			
VAG4			
VAG5			
VAG6	<i>C. albicans</i>	61	Não
VAG7	<i>C. albicans</i>	62	Não
VAG8	<i>C. albicans</i>	22	Não
VAG9	<i>C. albicans</i>	39	Não
VAG10	<i>C. albicans</i>	69	Não
VAG11	<i>C. parapsilosis</i>	72	Não
VAG12*	<i>C. albicans</i>	64	Não
VAG13	<i>C. albicans</i>	39	Não
VAG14	<i>N. glabratus</i>	37	Não
VAG15	<i>C. albicans</i>	34	Não
VAG16	<i>C. albicans</i>	77	Não
VAG17	<i>C. albicans</i>	20	Não
	<i>C. parapsilosis</i>	60	Sim

VAG18	<i>C. albicans</i>	49	Não
VAG19	<i>C. albicans</i>	70	Sim
VAG20	<i>C. albicans</i>	44	Não
VAG21	<i>C. albicans</i>	49	Não
VAG22	<i>C. albicans</i>	33	Não
VAG23	<i>C. albicans</i>	38	Não
VAG24	<i>C. albicans</i>	44	Não
VAG25	<i>C. albicans</i>	44	Não

*Utente grávida

4.2. Análise comparativa

4.2.1. Relação da faixa etária entre os isolados urinários e vaginais

Nos isolados de uroculturas de utentes masculinos, observou-se maior distribuição na faixa etária dos 80-89 anos, com cerca de 65% (n=11 isolados). Por outro lado, observou-se menor representatividade nas faixas etárias mais jovens, como se verifica no gráfico da Figura 8. Porém, a média das idades dos pacientes destes isolados em estudo é de 78 anos, sendo o paciente de onde se obteve o isolado com a idade mais baixa de 41 anos e com a idade mais alta de 90 anos.

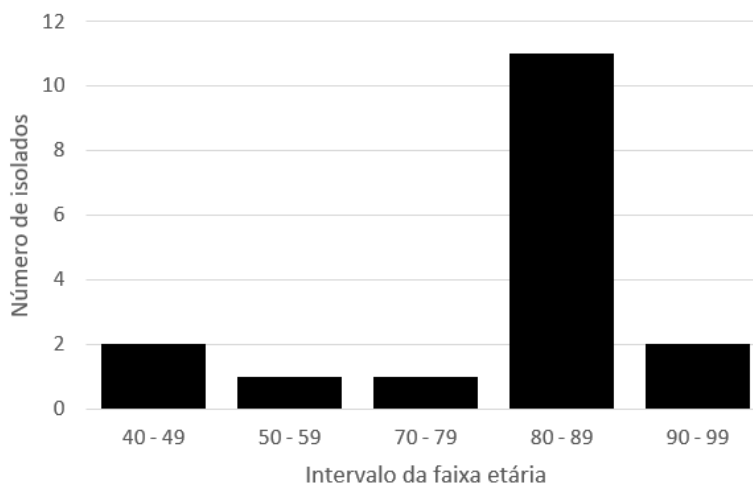


Figura 8 - Representação gráfica da distribuição dos pacientes masculinos com infeção urinária segundo faixa etária.

Nas amostras de uroculturas de utentes femininas foi registado maior número de isolados entre os 80-89 anos (n=5 isolados). Por outro lado, registou-se apenas 4 isolados na idade fértil (20 – 50 anos), tal como se verifica no gráfico da Figura 9. Portanto, a média das idades nesta população de estudo é de 72 anos, sendo que a idade mais baixa é de 28 anos e com a idade mais alta é de 95 anos.

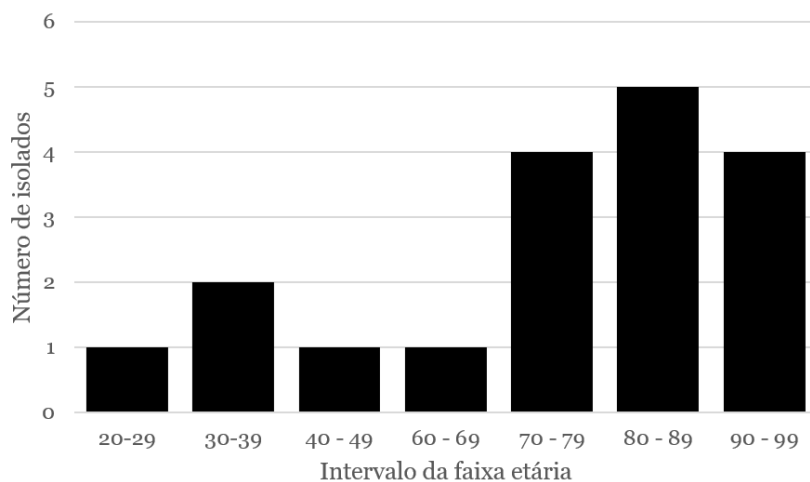


Figura 9 - Representação gráfica da distribuição das pacientes femininas com infecção urinária segundo faixa etária.

Em relação às amostras de exsudado vaginal representadas no gráfico da Figura 10, verificou-se uma diferença na distribuição nas faixas etárias com os isolados da Figura 9. Isto é, o intervalo dos 30-39 anos é a faixa etária mais prevalente, com 6 isolados. No entanto, registou-se 13 isolados de infecção vaginal por *Candida* durante a idade fértil até à menopausa, ou seja, dos 20 aos 50 anos.

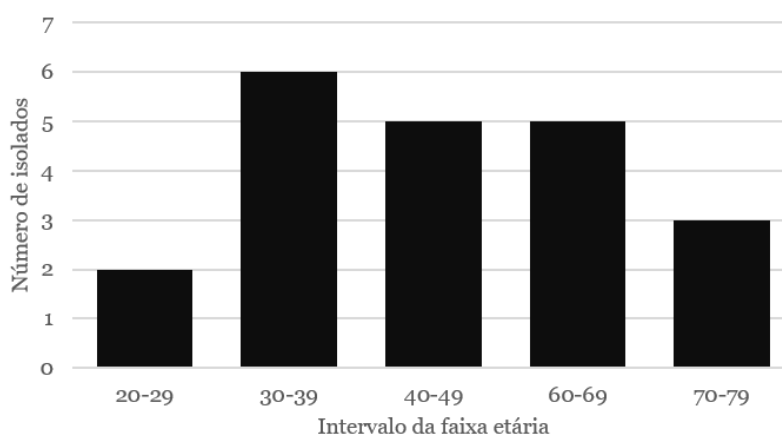


Figura 10 - Representação gráfica da distribuição das pacientes com candidose vaginal segundo faixa etária.

Dos 3 grupos de isolados, apenas nas uroculturas verifica-se em comum maior distribuição a partir da menopausa/andropausa, isto é, há maior semelhança entre os grupos de pacientes com infecção urinária (sexo feminino e masculino) comparativamente com as utentes diagnosticadas com candidose vulvovaginal.

4.2.2. Relação do estado clínico entre os isolados urinários e vaginais

Os pacientes em estudo, dos quais foram recolhidos as uroculturas masculinas, verificou-se que 47% é classificada como saudável (n=8 isolados), sendo desconhecida qualquer outro dado clínico referente à sua saúde. Em contrapartida, 41% são diabéticos (n=7 isolados) e 12% são imunossuprimidos (n= 2 isolados), tal como demonstra a Figura 11.

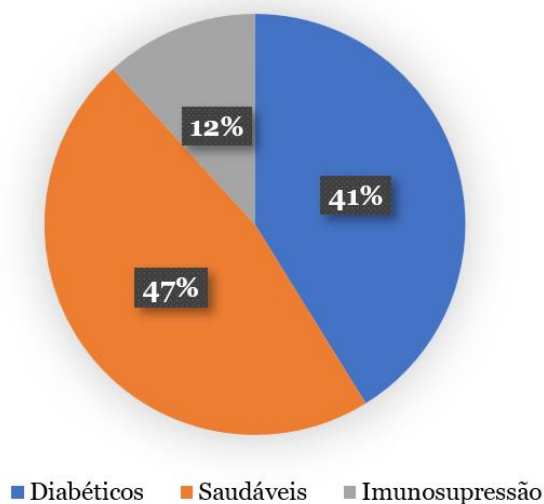


Figura 11 - Representação gráfica da distribuição do estado clínico dos pacientes do sexo masculino com infecção urinária.

Acerca das pacientes femininas representadas na Figura 12, verifica-se uma diferença entre utentes saudáveis (n=9 isolados) e utentes com diabetes (n=6 isolados). Por outro lado, 17% corresponde a grávidas (n=3 isolados).

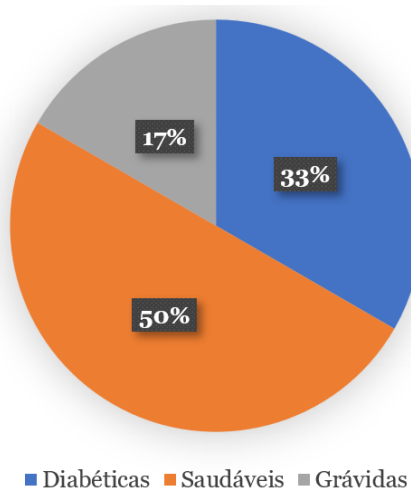


Figura 12 - Representação gráfica da distribuição do estado clínico dos pacientes do sexo feminino com infecção urinária.

Ao contrário dos resultados apresentados anteriormente, as senhoras diagnosticadas com candidose vulvovaginal (isolados de exsudado vaginal) demonstraram que 5% das mulheres são grávidas (n=1) e 9% têm diabetes mellitus (n=2). Por fim, 86% das pacientes são classificadas como saudáveis (n=18) por não haver conhecimento de mais alguma outra condição de saúde subjacente.

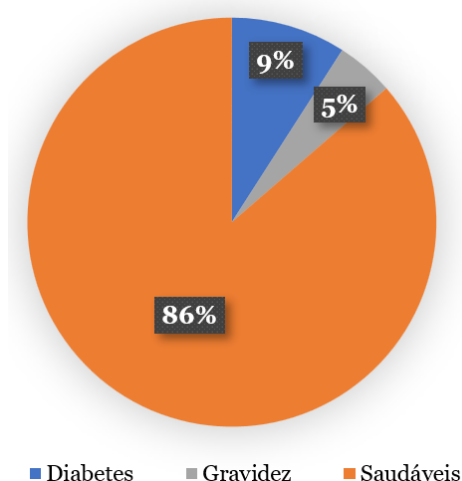


Figura 13 - Representação gráfica da distribuição do estado clínico das pacientes com candidose vulvovaginal.

4.2.3. Relação da distribuição das espécies entre amostras urinárias

Em isolados de uroculturas masculinas, verificou-se a presença de 4 espécies de leveduras tal como demonstra na Figura 14, *C. parapsilosis*, *C. ciferrii*, *C. guilliermondii* e a *C. albicans*, sendo esta última a mais prevalente com cerca de 82% (n=14 isolados). As restantes encontram-se em empate (6%), pois obteve-se 1 isolado de cada espécie.

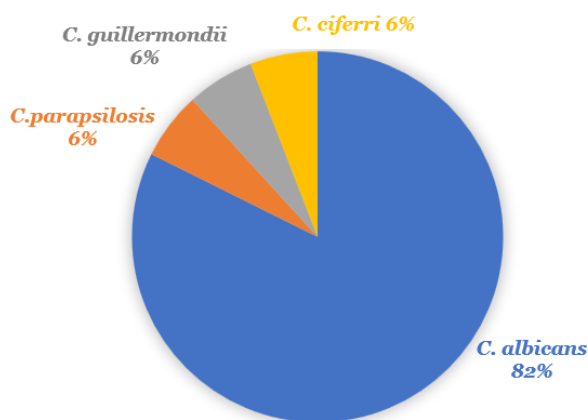


Figura 14 - Representação gráfica da distribuição das espécies em isolados das uroculturas provenientes de pacientes do sexo masculino.

Nas amostras de utentes femininas, apenas se verifica a presença de 3 leveduras, *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *N. glabratus*, representado nas Figuras 15 e 16. Deste modo, em ambos os grupos, verificou-se uma igual distribuição, estando em primeiro lugar a *C. albicans*, seguida pela *N. glabratus* e por fim, a *C. parapsilosis*.

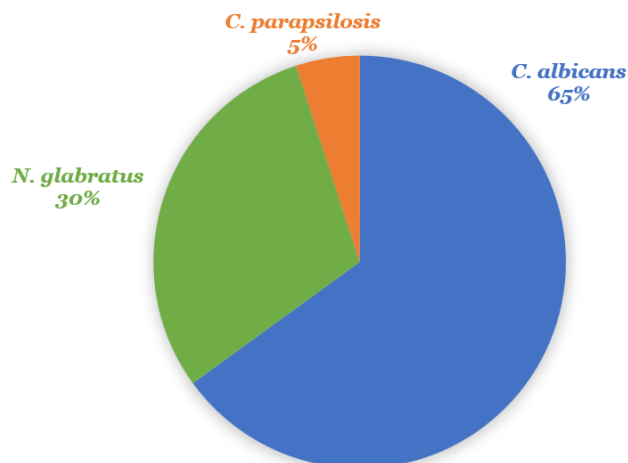


Figura 15 - Representação gráfica da distribuição das estirpes em isolados de uroculturas provenientes de utentes do sexo feminino.

No caso das amostras de utentes femininas com infecção urinária, obtiveram-se 13 isolados com *C. albicans*, 6 isolados com *N. glabratus* e por último, 1 isolado da espécie *C. parapsilosis*.

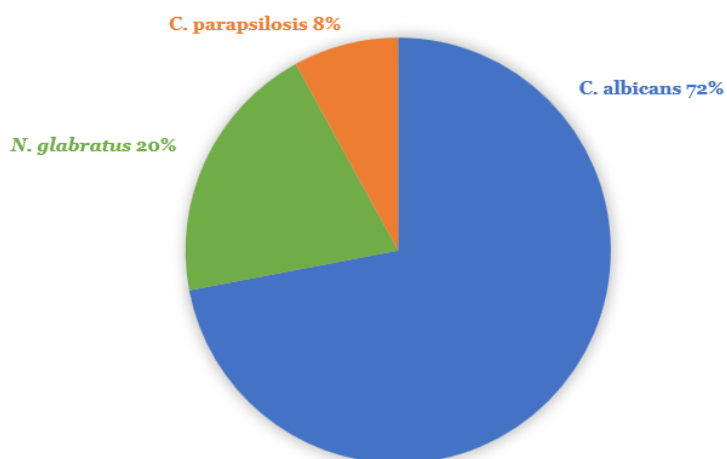


Figura 16 - Representação gráfica da distribuição das estirpes em isolados de exsudado vaginal.

E nos 25 isolados de exsudado vaginal, verificou-se 18 isolados com *C. albicans*, 5 com *N. glabratus* e 2 com *C. parapsilosis*.

4.3. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi avaliada através do comportamento das leveduras quando expostas ao fluconazol e clotrimazol. Na Tabela 10 e 11 podemos verificar, o CMI correspondente a 50% de crescimento microbiano, para as respectivas espécies isoladas nas amostras urinárias.

Tabela 10 - As concentrações mínimas inibitórias de todas as leveduras obtidas dos isolados de urina para o fluconazol ($\mu\text{g/ml}$).

	<i>C. albicans</i>	<i>N. glabratus</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. ciferrii</i>
Masculino	≤ 2	≤ 2	≤ 2	≤ 2	≤ 2
Feminino	≤ 2	≤ 2	≤ 2	-	-

Tabela 11 - As concentrações mínimas inibitórias de todas as leveduras obtidas dos isolados de urina para o clotrimazol ($\mu\text{g/ml}$).

	<i>C. albicans</i>	<i>N. glabratus</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. ciferrii</i>
Masculino	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1
Feminino	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1

Em todas as leveduras obtidas das uroculturas, verificou-se maior sensibilidade ao clotrimazol comparativamente com o fluconazol. Através da Tabela 12, verifica-se que as leveduras dos isolados de exsudado vaginal, demonstraram resistência a ambos os antifúngicos nas espécies *C. albicans* e *N. glabratus*.

Tabela 12 - As concentrações inibitórias mínimas dos isolados da vagina para fluconazol e clotrimazol ($\mu\text{g/ml}$).

	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>N. glabratus</i>
Fluconazol	$\leq 2 - >64$	≤ 2	$\leq 2 - 64$
Clotrimazol	$32 - >64$	≤ 2	$\leq 2 - 8$

Para além disso, verifica-se maior resistência de *N. glabratus* ao fluconazol, enquanto a *C. albicans* apresenta ser mais resistente ao clotrimazol. Porém, a *C. parapsilosis* apresentou o MIC $\leq 2 \mu\text{g/mL}$, demonstrando sensibilidade a ambos os antifúngicos.

4.4. Formação de biofilme

Nas leveduras provenientes de isolados de pacientes do sexo masculino com infecção urinária

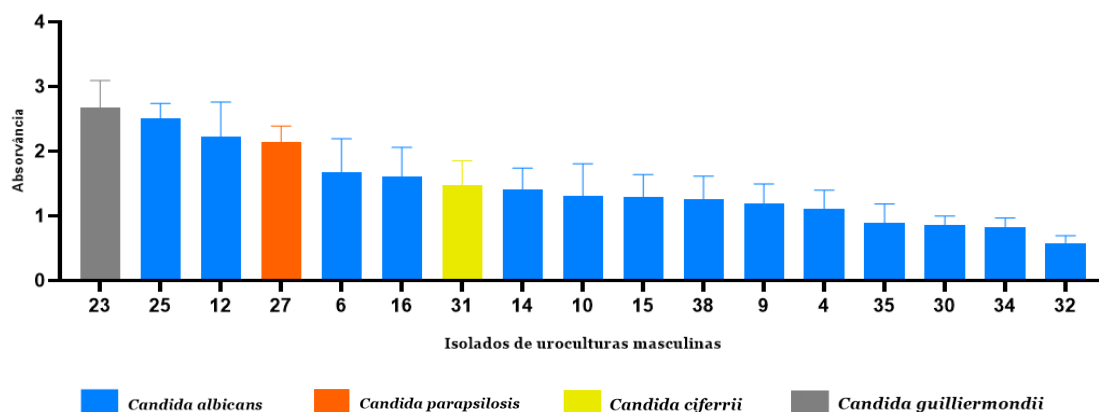


Figura 17 - Formação de biofilmes das leveduras das uroculturas provenientes de utentes do sexo masculino a 37°C após as 24h de incubação com a absorvância a 590nm, e respetivo desvio-padrão. Valores de $p < 0,05$, sendo considerados estatisticamente significativos.

Das estirpes encontradas nas amostras urinárias masculinas, observa-se que a *C. guilliermondii* (isolado 23) é a levedura que produz mais biofilme em relação às restantes. Nas amostras com *C. albicans* a que forma mais biofilme pertence ao utente do isolado 25 e a que forma menos biofilme é do isolado 32.

Nas leveduras provenientes de isolados de pacientes do sexo feminino com infecção urinária

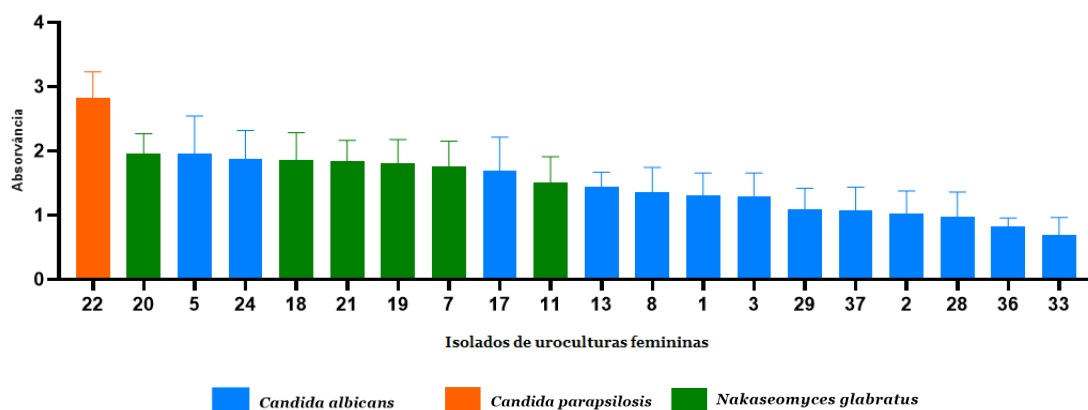


Figura 18 - Formação de biofilmes das leveduras das uroculturas provenientes de utentes do sexo feminino a 37°C após 24h de incubação com a absorvância a 590nm, e respetivo erro padrão. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Através da representação gráfica na Figura 18, observa-se que as leveduras isoladas de utentes femininas, são ótimas produtoras de biofilme. Entretanto, a *C. parapsilosis* (o isolado 22) foi a que produziu mais biofilme, por outro lado, a *C. albicans* (isolado 33) foi o que produziu menos biofilme.

Nas leveduras isoladas de exsudado vaginal provenientes de pacientes com candidose vulvovaginal

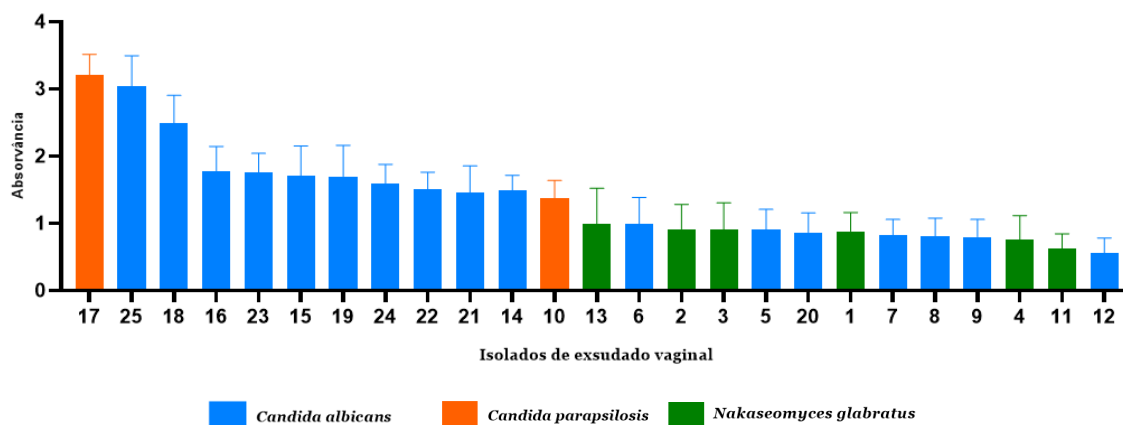


Figura 19 - Formação de biofilmes das leveduras de isolados de exsudado vaginal a 37°C após 24h de incubação com a absorvância a 590nm, e respetivo erro padrão. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Acerca dos biofilmes formados pelas leveduras dos isolados demonstrados na Figura 19, observou-se maior produção de biofilme na *C. parapsilosis* (isolado 17). Dentro dos isolados *C. albicans*, o que formou mais biofilme foi o isolado 25 e o que formou menos biofilme foi o isolado 12. Por fim, dos cinco isolados com *N. glabratus*, a que formou mais biofilme foi o isolado 13.

Nas leveduras isoladas das amostras de utentes grávidas

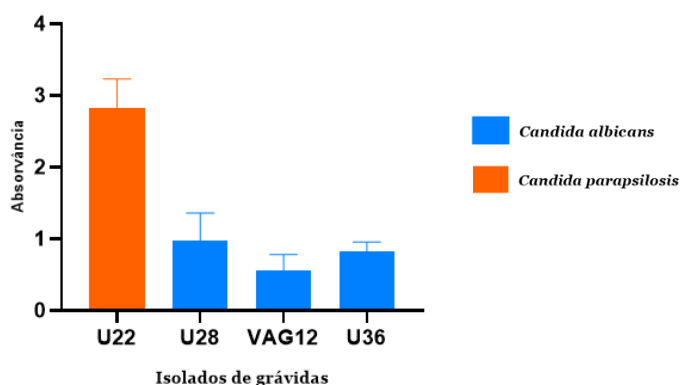


Figura 20 - Formação de biofilmes das leveduras dos isolados de utentes grávidas a 37°C após 24h de incubação com a absorvância a 590nm, e respetivo erro padrão. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Através dos 4 isolados de mulheres grávidas (correspondendo a três uroculturas e um exsudado vaginal), representados na Figura 20, é visível maior valor de biomassa total no isolado U22 que corresponde à *C. parapsilosis* em comparação com os restantes (*C. albicans*).

4.4.1. Visualização da formação de biofilme

Através da utilização do microscópio invertido, obteve-se as fotografias dos biofilmes formados das quatro leveduras isoladas nas uroculturas provenientes de utentes do sexo masculino (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. ciferrii*) após as 24h de incubação a 37°C com as respetivas ampliações, como se pode verificar na Figura 21. Em adição, também se obteve imagens de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *N. glabratus* das amostras de uroculturas provenientes de utentes do sexo feminino e as amostras vaginais, como podemos verificar nas Figuras 22 e 23, respetivamente.

Biofilmes de leveduras isoladas de uroculturas provenientes de utentes do sexo masculino

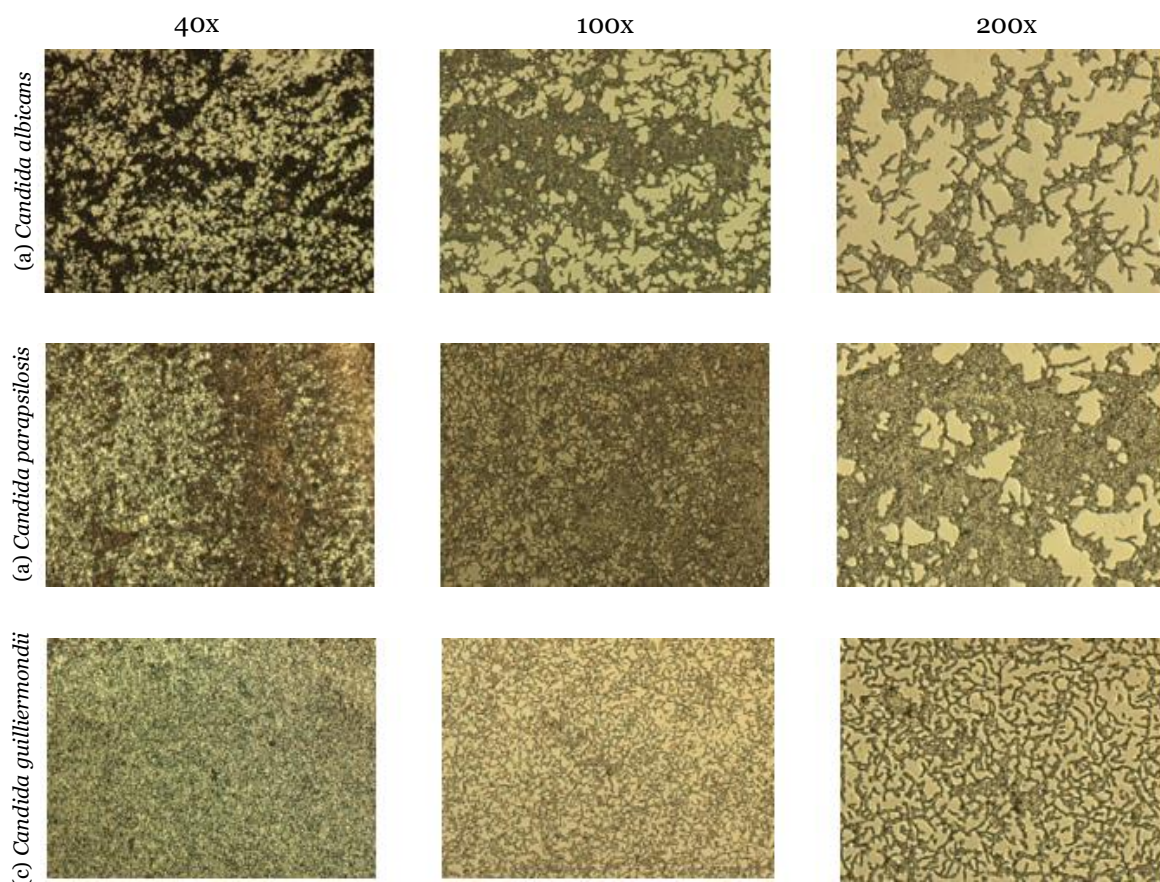




Figura 21 – Imagens de biofilmes formados pelas leveduras de quatro isolados de uroculturas de pacientes do sexo masculino, obtidos pelo microscópio invertido com ampliação 40x, 100x e 200x. (a) Biofilme formado pela *C. albicans* isolada da urolcultura 15; (b) Biofilme formado pela *C. parapsilosis* isolada da urolcultura 27; (c) Biofilme formado pela *C. guilliermondii* isolada da urolcultura 23 e (d) Biofilme formado pela *C. ciferrii* isolada da urolcultura 31.

Biofilmes de leveduras isoladas de uroculturas provenientes de utentes do sexo feminino

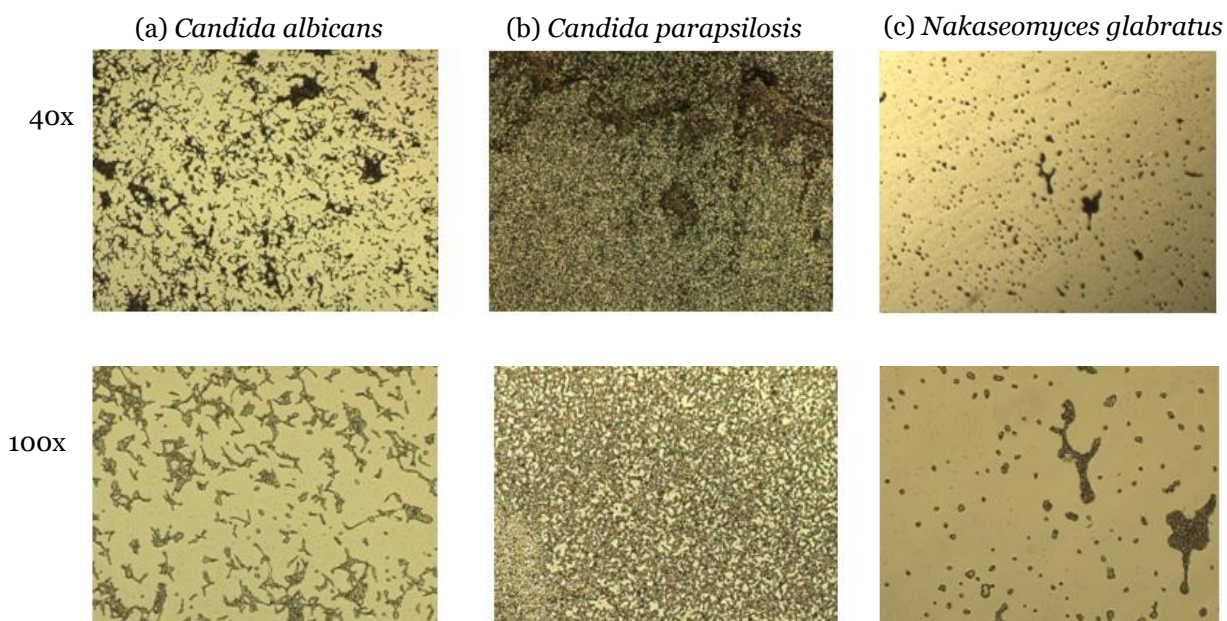


Figura 22 - Imagens de biofilmes formados pelas leveduras de 3 isolados de uroculturas provenientes de utentes do sexo feminino, obtidas pelo microscópio invertido com ampliação 40x e 100x. (a) Biofilme formado pela *C. albicans* isolada da urolcultura 3; (b) Biofilme formado pela *C. parapsilosis* isolada da urolcultura 22 e (c) Biofilme formado pela *N. glabratus* isolada da urolcultura 21.

Biofilme das leveduras obtidas de exsudado vaginal

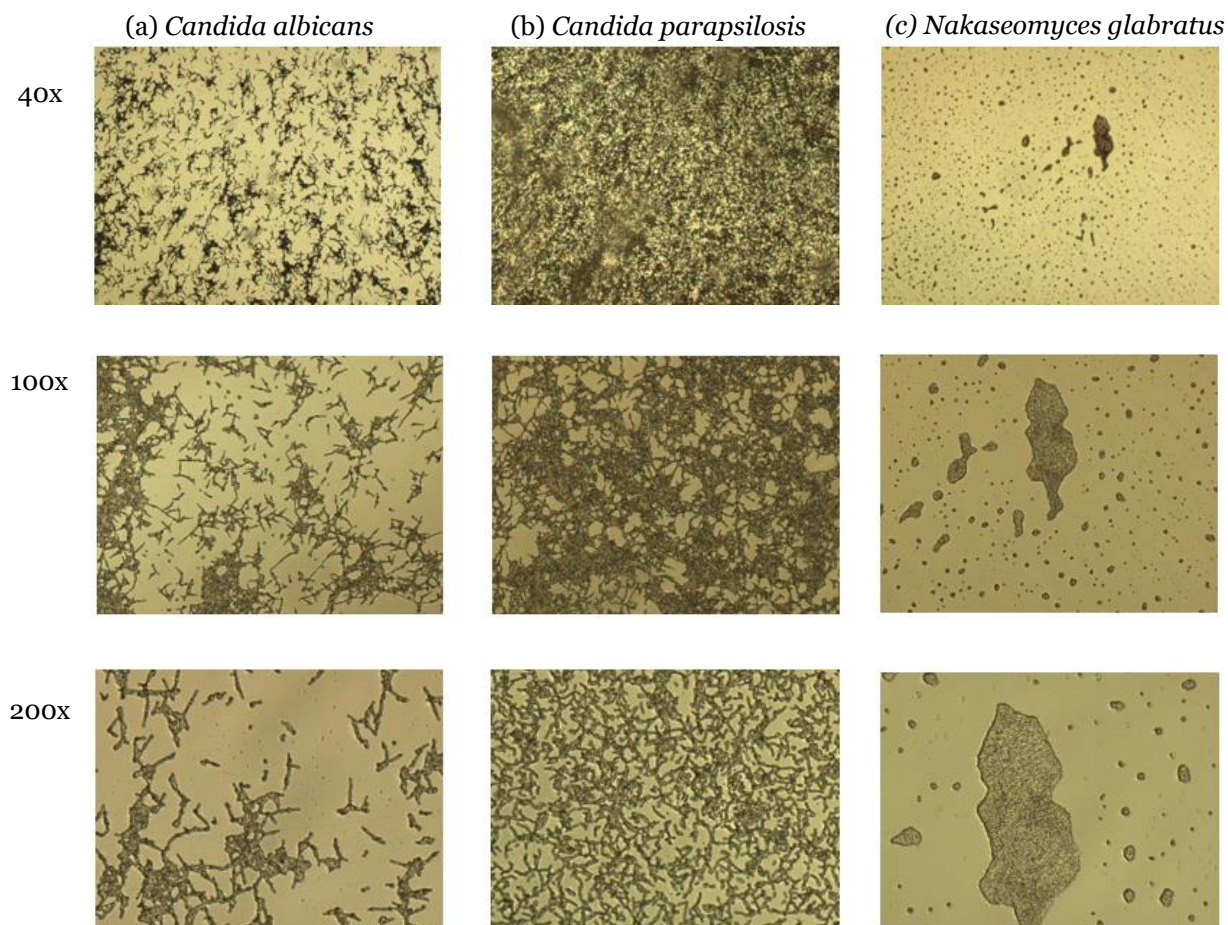


Figura 23 - Imagens de biofilmes formados pelas leveduras obtidas do exsudado vaginal, obtidas pelo microscópio invertido com ampliação 40x, 100x e 200x. (a) Biofilme formado pela *C. albicans* isolada da urolcultura 20; (b) Biofilme formado pela *C. parapsilosis* isolada da urolcultura 10 e (c) Biofilme formado pela *N. glabratus* isolada da urolcultura 13.

Com as imagens obtidas, pode-se verificar que os biofilmes das leveduras obtidas dos utentes do sexo masculino são mais densos em comparação às leveduras dos utentes do sexo feminino. Por outro lado, verificou-se algumas semelhanças dos biofilmes entre as leveduras obtidas em amostras urinárias provenientes de utentes do sexo feminino e as leveduras isoladas dos exsudados vaginais.

4.5. Formação de tubo germinativo

A formação de tubo germinativo é uma característica particular da *C. albicans*, sendo esta capaz de realizar a transição da forma de levedura para a forma hifal. Por isso, para a realização deste estudo selecionou-se 14 isolados de uroculturas provenientes de utentes do sexo masculino, 13 isolados de uroculturas provenientes de utentes do sexo feminino e 18 isolados de exsudado vaginal.

Após as 2h de incubação, contabilizou-se a média do total de hifas através da Equação 1 representada na secção 3.7. e a respetiva percentagem

Tabela 13 – Média do número total de hifas e a respetiva percentagem da capacidade de formação de tubo germinativo da *C. albicans* de utentes masculinos.

Isolados	Média	Percentagem %
U4	1,5	1%
U6	53,25	11%
U9	96,25	34%
U10	50,75	9%
U12	43,125	57%
U14	41,5	51%
U15	39,5	29%
U16	47	19%
U25	31,375	37%
U30	92,625	71%
U32	20,5	20%
U34	46,75	50%
U35	62,125	57%
U38	29,25	30%

Tabela 14 – Média do número total de hifas e a respetiva percentagem da capacidade de formação de tubo germinativo da *C. albicans* isolada de utentes femininas com infecção urinária.

Isolados	Média	Percentagem %
U1	85	67%
U2	47,875	27%
U3	26,375	7%
U5	37,625	6%
U8	31,375	5%
U13	63,625	25%
U17	157,375	40%
U24	8,5	4%
U28	126,375	16%

U29	7,125	1%
U33	41,625	9%
U36	96	33%
U37	69,75	16%

Em utentes femininas, verificou-se que a grande maioria dos isolados *C. albicans* apresenta uma taxa inferior a 20% de hifas formadas.

Tabela 15 – Média do número total de hifas e a respetiva percentagem da capacidade de formação de tubo germinativo da *C. albicans* de pacientes com candidose vulvovaginal.

Isolados	Média	Percentagem %
VAG5	98,875	8%
VAG6	24,25	4%
VAG7	0	0%
VAG8	182	47%
VAG9	151,75	13%
VAG11	85	22%
VAG12	192,75	39%
VAG14	100,25	72%
VAG15	72,125	65%
VAG16	73	10%
VAG18	162,625	38%
VAG19	144,875	31%
VAG20	59,875	12%
VAG21	80,75	9%
VAG22	67,75	12%
VAG23	110,25	73%
VAG24	42,625	10%
VAG25	51,25	9%

Na Tabela 15, demonstra que a *C. albicans* obtida do isolado VAG7 apresenta 0% de tubo germinativo, ou seja, microscopicamente não observamos qualquer hifa formada.

Tabela 16 - Distribuição de isolados pela respetiva percentagem de formação de tubo germinativo da *C. albicans*.

	Isolados de uroculturas		Isolado de exsudado vaginal
	Homem	Mulher	
< 10%	2	6	5
10 – 20%	3	2	5

21 – 30%	2	2	1
31 – 40%	2	2	3
50 – 60%	4	-	-
61 – 70%	-	1	1
71 – 80%	1	-	2
> 80%	-	-	-
Total	14	13	18

Dos 45 isolados com *C. albicans*, verificamos que 5 leveduras isoladas de uroculturas provenientes de utentes do sexo masculino obtiveram $\geq 50\%$ de hifas formadas, o que indica serem mais virulentas do que as restantes amostras. Enquanto, que as leveduras isoladas de uroculturas provenientes de utentes do sexo feminino (Tabela 14), demonstraram que apenas 1 amostra apresentou mais de 50% de hifas formadas. No total de 18 isolados de exsudado vaginal, verificou-se que, 3 deles apresentaram mais de 50% de hifas formadas.

4.6. Adesão da *C. albicans* às células HeLa

A adesão e colonização nas células HeLa por *C. albicans* foram caracterizadas pelo número de microrganismos recuperados em UFC/mL, após as 2h de infeção. Para isso, seleccionou-se 8 isolados através dos resultados dos ensaios da formação do tubo germinativo. Sendo as amostras U12, U30 e U35 são de uroculturas provenientes de utentes do sexo masculino, U1 e U17 são de uroculturas provenientes de utentes do sexo feminino, e por fim a VAG14, VAG15 e VAG23 são de exsudado vaginal. Determinou-se assim, a percentagem da suspensão que aderiu às células HeLa, tendo-se determinado o número de UFC/mL recuperado, como mostrado na Figura 24.

Tabela 17 – Média de UCF/mL e a respetiva percentagem de cada isolado que aderiu às células HeLa, comparando com o número inicial de UFC/mL.

Isolados	UCF/mL	Percentagem
U12	$0,27194 \times 10^6$	27%
U30	$0,25749 \times 10^6$	26%
U35	$0,256495 \times 10^6$	26%
U1	$0,416905 \times 10^6$	42%
U17	$0,462170 \times 10^6$	46%
VAG14	$0,386105 \times 10^6$	39%
VAG15	$0,37157 \times 10^6$	37%
VAG23	$0,36030 \times 10^6$	36%

Através da Tabela 17, observa-se que ambos os isolados de uroculturas provenientes de utentes do sexo feminino (U1 e U17) demonstraram maior capacidade de adesão/infeção, seguidos pelos isolados vaginais (VAG14, VAG15 e VAG23).

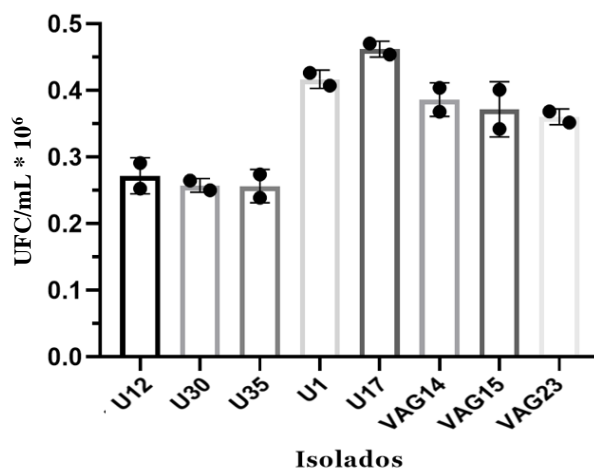
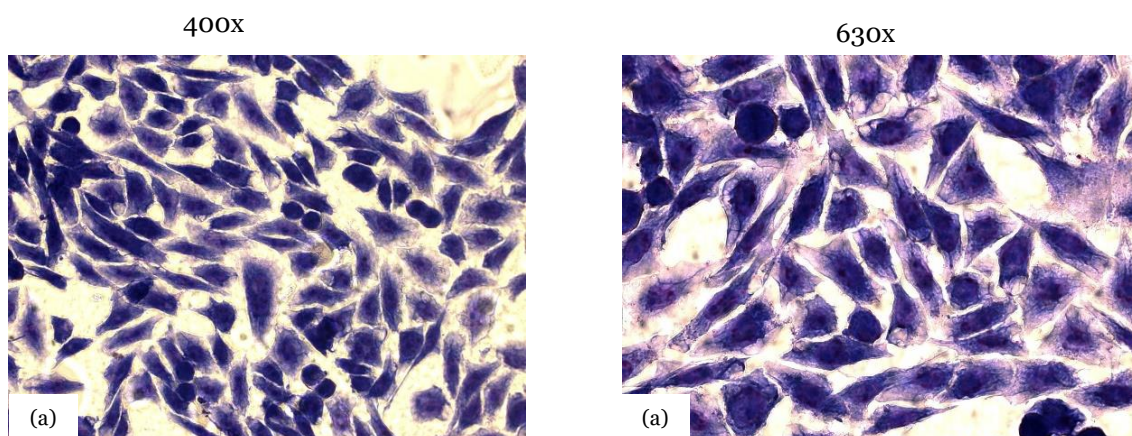


Figura 24 - Representação gráfica do número de Unidades Formadoras de Colônias/mL recuperado para cada isolado, após a adesão nas células HeLa.

A adesão nas células HeLa infetadas foi mais fraca nas leveduras isoladas de uroculturas provenientes de utentes do sexo masculino, tal como se observa na figura 24. Por outro lado, as leveduras isoladas de uroculturas provenientes de utentes do sexo feminino demonstraram uma adesão mais forte nas células HeLa. Além disso, a infecção das estirpes das amostras de exsudado vaginal mostraram-se ser relativamente idênticas entre si.

4.6.1. Visualização da adesão nas células HeLa

Com o auxílio do microscópio de fluorescência, adquiriu-se fotografias da infecção da *C. albicans* na linha celular do colo do útero após as 2h de incubação a 37°C, como se verifica na Figura 25. Para uma comparação entre os isolados, foi retirada uma fotografia ao controlo negativo (apenas tem a linha celular) e aos isolados U30, U1 e VAG23, respetivamente. Verificou-se a semelhança na infecção acentuada entre os isolados provenientes de pacientes do sexo feminino, logo o isolado de urocultura proveniente de um utente do sexo masculino possui visivelmente menor quantidade de células de *C. albicans* aderidas.



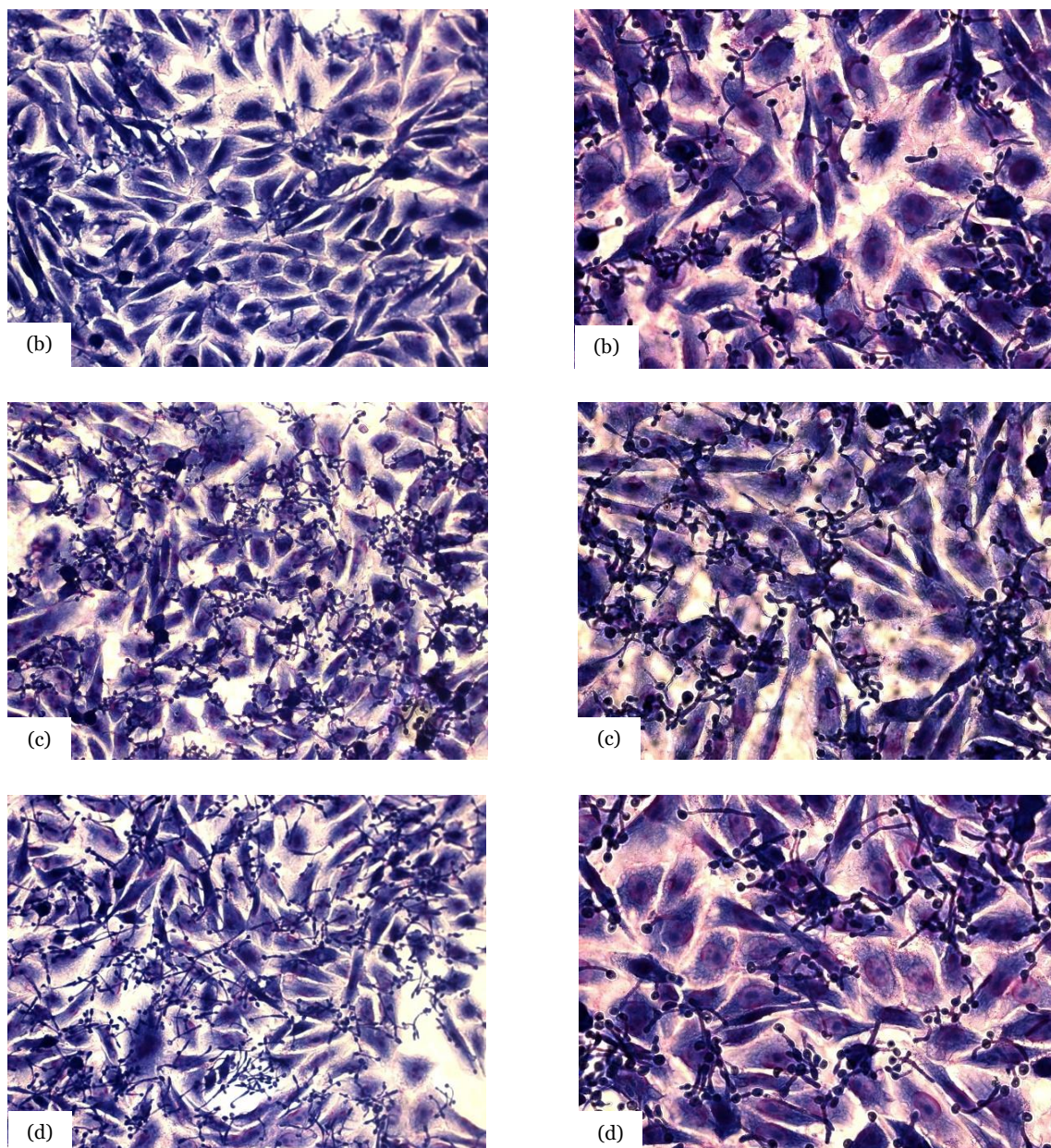


Figura 25 – Imagens microscópicas da infecção por *C. albicans* nas células HeLa, obtidas com ampliação 400x e 630x. (a) Controle negativo; (b) Isolado de urocultura provenientes de um utente do sexo masculino; (c) Isolado de urocultura proveniente de utentes do sexo feminino e (d) Isolado de exsudado vaginal.

Folha em branco

5. Discussão

A ITU está no top 3 das infecções mais comuns em humanos, sendo mais frequentes nos cuidados de saúde primários. Os estudos têm mostrado uma alta incidência nas mulheres, 1 em cada 2 mulheres têm pelo menos um episódio de infecção urinária ao longo da vida e 1 em cada 3 têm um episódio antes dos 24 anos. Para além disso, observa-se um pico de incidência de ITU não complicadas no género feminino entre os 18 e os 30 anos, coincidindo com a idade fértil (máxima atividade sexual e gravidez) [68].

Geralmente, a maioria das mulheres tem episódios esporádicos e respondem bem ao tratamento, embora haja cada vez mais casos de mulheres com candidose vulvovaginal recorrente devido à resistência aos antifúngicos. Estima-se, que cerca de 135 milhões de mulheres sofrem de candidose vaginal recorrente (70% delas são durante a gravidez) e 1,5 milhões padecem da doença, especialmente as grávidas [69].

Portanto, as infecções fúngicas são uma preocupação significativa na saúde pública devido às suas elevadas taxas de morbidade e mortalidade. Por isso, quanto mais rápido for o diagnóstico e tratadas da maneira mais adequada, menor serão as complicações associadas.

Contudo, não há estudos acerca da incidência de infecções urinárias por *Candida* em Portugal, assim como também é desconhecida a relação entre as infecções genito-urinárias. Deste modo, este estudo serviu para compreender a sua distribuição e a patogenicidade entre géneros num grupo muito restrito da população portuguesa.

A caracterização sociodemográfica da população em estudo mencionada nos resultados, o género e a idade são um fator de risco crucial no isolamento de *Candida* spp.. No total de isolados do trato urinário, 54% são provenientes de utentes do sexo feminino com idades entre 28 e 95 anos e as restantes do género masculino com idades entre 41 e 90 anos. Estes dados estão de acordo com a literatura, uma vez que os estudos demonstram haver uma maior distribuição nas mulheres e em pacientes de idades avançada [23, 24, 70]. Dentro destes fatores de risco, a incidência de candidemia a partir dos 70 anos é um fator preocupante porque a maioria dos pacientes deste estudo estão internados por causas que desconhecemos. Devido a estas causas, podem estar predispostos a desenvolver uma candidose invasiva que está relacionada com altas taxas de mortalidade a nível mundial. Num estudo no Brasil, o principal fator de risco em 132 casos de ITUs por *Candida* foi devido à exposição de terapia medicamentosa e o uso prolongado de cateteres urinários [71].

Quanto às amostras vaginais, obteve-se maior número de isolados de mulheres na idade fértil (13 isolados) do que de mulheres na menopausa (8 isolados). Estes dados corroboram com estudos anteriores, uma vez que mencionam maior distribuição em mulheres na idade reprodutiva, assim

como, em mulheres pós-menopausa que fazem terapia de substituição hormonal. O aumento da infecção por *Candida* spp nestas idades, coincide com outras condições subjacentes, como diabetes, imunossupressão, libertação hormonal, cancro, entre outros. A libertação hormonal, tem como consequência o aumento dos níveis de glicogénio nas células epiteliais, assim como diabetes, o que favorece o crescimento da *Candida* [72].

Em isolados provenientes de uroculturas, a *C. albicans* é a espécie mais prevalente tanto em uroculturas provenientes de utentes do sexo masculino como feminino. Porém, nas utentes femininas a segunda espécie mais frequentemente isolada é a *N. glabratus* (30%), seguida pela *C. parapsilosis* (5%). Em homens, não se verificou a presença da *N. glabratus*, mas em igual prevalência temos a *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e a *C. ciferrii*. No entanto, não há evidência na literatura acerca da distribuição de *Candida* spp. no tracto urinário do sexo masculino devido ao baixo número de candidúria em comparação com o sexo feminino.

Em isolados vaginais, a espécie de *Candida* não *albicans* com maior prevalência é a *N. glabratus*, seguida pela *C. parapsilosis*, estando em concordância com o estudo de Aroca (2020) na Espanha [27]. Contrariamente, ao estudo realizado por Czechowicz (2022), que demonstrou que a terceira espécie mais frequentemente isolada em episódios de candidose vaginal é a *C. tropicalis* [19], mas Hashemi (2019) demonstrou que no Irão a segunda espécie mais frequentemente isolada é *C. lusitaniae*, seguida pela *N. glabratus* [73]; na Arábia, o Venugopal (2020) demonstrou que *C. tropicalis* é a segunda espécie mais comumente isolada [74]. Entretanto, Bilal e coautores (2022) reportaram, a *N. glabratus* é a espécie menos comumente isolada na China [75]. Alguns fatores podem contribuir para as diferenças na distribuição das espécies de *Candida* em diferentes países como por exemplo, os padrões de tratamento, o estilo de vida e profilaxia.

Através da análise da origem das amostras urinárias, foi possível verificar maior incidência da infecção por *Candida* em internamentos (62%), seguido pelo serviço de urgência (24%) e por último, pelo serviço de consulta externa (14%). Estes dados estão em concordância com o estudo retrospectivo de Lima (2017), que observou em 106 pacientes diagnosticados com candidúria, dos quais 31,1% foram internados no serviço de cuidados intensivos, 31,1% em urgência, 19,0% em medicina interna, 7,5% na cardiologia, 4,7% nas unidades cirúrgicas, 3,8% na maternidade, 1,9% na enfermaria e 0,9% na unidade renal [76].

A suscetibilidade das espécies de *Candida* das amostras clínicas, aos antifúngicos fluconazol e clotrimazol, foi avaliada utilizando a metodologia de microdiluição em caldo. O fluconazol, é um dos medicamentos mais frequentemente prescritos contra a maioria das espécies de *Candida*, além disso, é crucial salientar que é um antifúngico triazólico com atividade fungistática e não fungicida [77]. O clotrimazol é um antifúngico imidazólico com propriedades antifúngicas mediadas pela interação com a síntese de ergosterol, que provoca o aumento da permeabilidade da parede celular das leveduras perturbando a sua estrutura e função [78]. Para além disso, é dos

medicamentos mais recomendados para o tratamento tópico da candidose vulvovaginal e balanite por *Candida* [79].

As estirpes presentes nos isolados de uroculturas demonstraram sensibilidade aos antifúngicos, sendo que a sensibilidade é ainda maior quando expostos ao clotrimazol, assim como, a *C. parapsilosis* dos isolados de exsudado vaginal. Por outro lado, as restantes leveduras provenientes de isolados de exsudado vaginal, a *C. albicans* demonstrou o MIC ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$ a >64 $\mu\text{g/mL}$ ao fluconazol e 32 $\mu\text{g/mL}$ a >64 $\mu\text{g/mL}$ ao clotrimazol. Enquanto, a *N. glabratus* obteve o MIC ≤ 2 a 64 $\mu\text{g/mL}$ ao fluconazol e ≤ 2 a 8 $\mu\text{g/mL}$ ao clotrimazol. Apesar de ambas as leveduras demonstrarem resistência a ambos os antifúngicos, é visível que a *C. albicans* é ainda mais resistente. Vários estudos demonstraram o surgimento de resistência antifúngica das leveduras em casos de candidose vulvovaginal, tais como a *C. albicans* e de *N. glabratus* [80, 81]. Além disso, as espécies não *albicans* também demonstraram resistência aos antifúngicos [81]. Na Europa, é visível a variação dos perfis de suscetibilidade antifúngica das espécies de *Candida* isoladas de pacientes com candidose vulvovaginal. Por exemplo, um estudo na Grécia mostrou que 3,7% de 933 isolados de *C. albicans* foram classificados como resistentes ao fluconazol. Além disso, também demonstraram que 98,8% dos 168 isolados de *N. glabratus* eram sensíveis dose-dependentes, e todos os isolados de *C. parapsilosis* foram 100% sensíveis [82]. Em Portugal, Fernandes estudou 54 isolados de *C. albicans* e 52 isolados de *N. glabratus*, dos quais 3,7% e 13,5% respetivamente, demonstram resistência ao fluconazol a 64-256 $\mu\text{g/mL}$, assim como em 25% dos isolados de *C. parapsilosis* se mostraram resistentes ao fluconazol a 6-32 $\mu\text{g/mL}$ [83]. Em Itália, 3,5% dos 175 isolados de *C. albicans* e 4,5% de 22 isolados *N. glabratus* eram sensíveis ao fluconazol [84]. Na França, as amostras com *C. albicans* e com *C. parapsilosis* foram sensíveis ao fluconazol [85]. Na Espanha, Aroca mostrou que dos 896 isolados recolhidos de pacientes com candidose, 10 de *N. glabratus* e 4 de *C. albicans*, são resistentes ao fluconazol [27]. Por outro lado, na Polónia, 97% de 61 isolados de *C. albicans* se mostraram sensíveis ao clotrimazol (< 1 $\mu\text{g/mL}$), assim como 76% de 38 isolados de *N. glabratus* [86]. Na china, 88,7% de 115 pacientes diagnosticadas com candidose vulvovaginal e tratadas com clotrimazol, demonstraram livres da doença ao fim de 7 a 14 dias [87].

A infecção nosocomial das espécies de *Candida* tem sido relacionada com o uso de dispositivos médicos, como cateteres devido à formação de biofilme que por sua vez, oferece um risco aumentado de patogenicidade e resistência antimicrobiana. Portanto, os biofilmes estão correlacionados com o crescimento de microrganismos oportunistas, tais como a *Candida* [88]. Neste estudo, foi avaliada a capacidade de formação de biofilme em amostras de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. ciferrii* e *N. glabratus* através da quantificação da biomassa total corada com o cristal violeta. Em relação aos isolados de uroculturas provenientes de utentes do sexo feminino, é visível maiores quantidades de biomassa na *C. parapsilosis*, sendo este isolado associado a uma paciente grávida.

Os isolados de *N. glabratus* apresentaram valores de biomassa semelhantes entre si, enquanto entre os isolados de *C. albicans*, U5 foi o que demonstrou maior valor de biomassa total estando associado a uma paciente de diabetes e internada com 87 anos. No entanto, estes resultados não corroboram com os estudos anteriores, que reportam que a *C. albicans* é um forte produtor de biofilme, seguido pela *N. glabratus* e em último, a *C. parapsilosis* [89]. Nos isolados de uroculturas provenientes de utentes do sexo masculino, a *C. guilliermondii* apresentou maior quantidade de biomassa, seguida pela *C. albicans* e *C. parapsilosis*, respetivamente, sendo estes últimos isolados de pacientes internados.

Nos isolados de exsudado vaginal, o segundo isolado com maior valor de biomassa total foi VAG25, seguido pela amostra VAG 18, ambos de *C. albicans*. A diferença dos isolados VAG 25 e 18, é especificamente a idade das mulheres, 44 e 49 anos, respetivamente. A literatura evidencia que a formação de biofilmes na *C. albicans* é fortemente densa, seguido pela *N. glabratus*, desvalorizando os biofilmes da *C. parapsilosis* [8990], o que não corrobora com as fotografias retiradas aos biofilmes.

Dentro do grupo de isolados de utentes grávidas, 3 de uroculturas (1 de *C. parapsilosis* e 2 de *C. albicans*) e 1 de exsudado vaginal de *C. albicans*, a *C. parapsilosis* forma mais biomassa, no entanto, a diferenças entre os isolados de *C. albicans* são pouco significativas. Vários estudos evidenciam que as mulheres grávidas correm maior risco de ITUs, afetando cerca de 2% a 10% das mulheres grávidas. Porém, a taxa de CVV varia com a idade, período de gestação, idade, estado clínico, entre outros. No estudo feito por Laari em Ghana, evidenciou que em 250 grávidas, 57,6% sofram diagnosticadas com CVV, 33,5% com candidúria, e por fim, 8,9% de bacteriúria. Desta forma, demonstrou que as mulheres no primeiro trimestre de gravidez são mais propensas a contrair infeções em comparação com as mulheres no terceiro trimestre, devido às rápidas mudanças hormonais que estão associadas ao primeiro trimestre da gravidez, e é nesta fase da gravidez que as mulheres sofrem sintomas desagradáveis da gravidez [91].

Contudo os resultados corroboraram com o estudo feito na Índia, confirmando que a taxa de colonização por *Candida* aumenta durante a gravidez, em particular no terceiro trimestre, sendo a *C. albicans* como o principal agente colonizador de CVV, seguido por *N. glabratus*, *C. krusei* e *C. tropicalis* [72]. Estes dados alarmantes, demonstram evidências emergentes do aumento e diversidade de colonização de espécies de *Candida* em grávidas, levando ao aumento de complicações relacionadas à gravidez, como por exemplo, parto prematuro e baixo peso ao nascer.

Estudos mencionam, que a *C. albicans* em específico, pode apresentar-se em 2 fases (dimorfismo): a fase de levedura e a fase de hifa filamentosa, sendo que a forma de hifa está associada à infecção invasiva, capaz de penetrar ativamente nas células epiteliais e estabilizar biofilmes maduros [92]. Entretanto, a fase de levedura é responsável pela distribuição e

disseminação de *C. albicans*. Posto isto, a transição entre as fases de levedura e hifa são cruciais para a progressão e regulação dos processos de infecção [93]. A avaliação da formação do tubo germinativo neste estudo, procedeu-se à quantificação de hifas em cada isolado. Desta forma, verificou-se que 36% dos 14 isolados de uroculturas provenientes de utentes do sexo masculino, 17% de 18 isolados de exsudado vaginal e 8% dos 13 isolados de uroculturas provenientes de utentes do sexo feminino, demonstraram o número significativo de hifas formadas ($\geq 50\%$).

Nas amostras de uroculturas provenientes de utentes do sexo masculino, a U30 revelou ser o isolado com mais hifas formadas, com cerca de 71%, e a U4 foi o isolado com menos hifas formadas (1%). Para além disso, os fatores de risco entre os isolados são relativamente idênticos, isto é, dos 5 isolados 4 são de doentes internados com idades compreendidas dos 80 aos 90 anos. Porém, 3 deles são pacientes diagnosticados com candidúria têm diabetes. Contudo não há dados na literatura a contestar estes resultados, pelo que será necessário proceder a mais investigações nesta linha de estudo em relação às infeções urinárias. Enquanto, nas uroculturas provenientes de utentes do sexo feminino, o isolado U1 com 67% de hifas é de uma mulher diabética internada na UCI. Em relação às amostras vaginais, apenas 3 demonstraram $\geq 50\%$ de hifas formadas, sendo 73% da VAG23, 72% da VAG14 e 65% da VAG15. Destes isolados, as mulheres não são diabéticas e desconhece-se se há ou não outro problema de saúde subjacente. Contudo, não há evidência na literatura acerca da comparação dos diferentes nichos ou a corroborar estes resultados.

Por último, a adesão da *C. albicans* às células HeLa foi maior isolados provenientes de uroculturas de utentes do sexo feminino, seguido pelos 3 isolados de exsudado vaginal. Por isso, os isolados do tracto urinário masculino demonstraram uma adesão significativamente menor em relação aos isolados anteriores, como seria expectável. Portanto, a *C. albicans* isolada do tracto genito-urinário feminino expressou significativamente uma capacidade aumentada de invasão e interações levedura-hospedeiro. Não foi possível encontrar na literatura estudos a contestar estes resultados, pelo que será necessário proceder a mais investigações nesta linha de estudo em relação às infeções urinárias.

Folha em branco

6. Conclusão

As infecções causadas pelas leveduras do género *Candida* constituem um grande problema terapêutico, principalmente para pacientes imunodeprimidos e grávidas. Um dos fatores mais sérios na patogenicidade das espécies de *Candida* é a capacidade de formar biofilmes, influenciando na resistência significativa ao tratamento antifúngico, e em consequência limitando a entrada de substâncias através da matriz extracelular. Este impedimento, protege de alguma forma as células fúngicas das respostas imunológicas do hospedeiro constituindo uma ameaça do ponto de vista clínico, progredindo para infecções irreversíveis.

Neste estudo, foi demonstrado que as espécies clinicamente importantes em mulheres incluem a *C.albicans* e *N. glabratus*, e em homens a *C.albicans* e *C. guilliermondii*, que por sua vez, representam um risco elevado, principalmente em ambiente hospitalar, onde aparecem como patógenos nosocomiais em pacientes cronicamente doentes e/ou pós-operatório.

Entretanto a distribuição das espécies de leveduras no trato urinário feminino é diferente do trato urinário masculino, mas os perfis de suscetibilidade antifúngica são os mesmos. No entanto, os isolados de *Candida* do trato urinário expressaram fatores de virulência relevantes, evidenciando a necessidade de mais estudos para desvendar o potencial patogénico da levedura urinária. Contudo as leveduras provenientes de uroculturas de pacientes do sexo feminino demonstraram maior capacidade de infeção e virulência em relação a todos os outros isolados. Porém, as leveduras obtidas dos isolados de pacientes com candidose vulvovaginal demonstraram resistência a ambos os antifúngicos devido à possibilidade de estas já terem sido expostas noutra nicho.

Para além disso, neste estudo verificou-se que os isolados com maior virulência são de pacientes hospitalizados com idade avançada e utentes grávidas, sendo estes um grande grupo de risco devido à capacidade da *Candida* em aderir às superfícies inanimadas dos dispositivos médicos inseridos no paciente. A elucidação dos principais mecanismos entre infeções urinárias e as infeções vaginais é essencial para avançar na compreensão e no tratamento de infeções invasivas por *Candida*.

Folha em branco

7. Limitações e perspectivas futuras

Apesar de termos analisado as culturas de *Candida spp.* durante um curto período de tempo, estas não representam de forma geral a população devido à natureza desta investigação, sendo necessário ter cautela na análise de dados e interpretar os resultados de fontes secundárias. A população em estudo das infecções urinárias é limitada apenas aos utentes atendidos pelo CHUCB em específico. Quanto aos resultados das amostras de exsudado vaginal, apenas se restringe às pacientes atendidas no consultório privado, logo não tem representabilidade na população nacional. Portanto, é de extrema importância estudar o padrão destas infecções a nível nacional, chegando a uma conclusão da sua distribuição entre género e a distribuição das estirpes.

Apesar de ser um estudo *observacional* e analítico, é um assunto de grande interesse na saúde pública e uma preocupação global da OMS. Deste modo, é crucial a realização de estudos que avaliem a resistência e a formação de biofilmes em isolados recolhidos no trato urinário como no trato genital do mesmo paciente diagnosticado com infecção urinária ou vaginal por *Candida*. Assim como, também seria o ideal estudar as amostras urinárias dos parceiros das utentes diagnosticadas com infecção vaginal, com o intuito de perceber se há alguma influência.

Para além disso, seria interessante estudar o crescimento e a adesão dos isolados em linhas celulares da epiderme (células HaCaT), bem como em linhas celulares renais de murganho macho e fêmea, para chegar a alguma conclusão acerca da sua capacidade de infecção e adaptação, para uma melhor compreensão das consequências que podem trazer à saúde urogenital.

Contudo, a falta de literatura científica em Portugal sobre a relação e a distribuição de *Candida spp* no trato urinário e vaginal tornou desafiadora a comparação dos resultados.

Folha em branco

8. Referências bibliográficas

- [1] De Seta, F., Lonnee-Hoffmann, R., Campisciano, G., Comar, M., Verstraelen, H., Vieira-Baptista, P., Ventolini, G., & Lev-Sagie, A. (2022). The Vaginal Microbiome: III. The Vaginal Microbiome in Various Urogenital Disorders. *Journal of Lower Genital Tract Disease*, 26(1), 85–92. <https://doi.org/10.1097/LGT.0000000000000645>
- [2] Requena, T., & Velasco, M. (2021). The human microbiome in sickness and in health. *Revista Clínica Española (English Edition)*, 221(4), 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.rceng.2019.07.018>
- [3] Teixeira, H., Freitas, A., Sarmiento, A., Nossa, P., Gonçalves, H., & Pina, M. de F. (2021). Spatial patterns in hospital-acquired infections in Portugal (2014–2017). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(9), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijerph18094703>
- [4] Bongomin, F., Gago, S., Oladele, R. O., & Denning, D. W. (2017). Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. *Journal of Fungi*, 3(4). <https://doi.org/10.3390/jof3040057>
- [5] Wu, X., Lu, Y., Zhou, S., Chen, L., & Xu, B. (2016). Impact of climate change on human infectious diseases: Empirical evidence and human adaptation. *Environment International*, 86, 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.09.007>
- [6] Nnadi, N. E., & Carter, D. A. (2021). Climate change and the emergence of fungal pathogens. *PLoS Pathogens*, 17(4), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009503>
- [7] World Health Organization. (2022). WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. *Antimicrobial Resistance Division (ed.)*. In Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO (Vol. 1). <https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241>
- [8] Benedict, K., Whitham, H. K., & Jackson, B. R. (2022). Economic Burden of Fungal Diseases in the United States. *Open Forum Infectious Diseases*, 9(4), 6–9. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofac097>
- [9] Neugent, M. L., Hulyalkar, N. V., Nguyen, V. H., Zimmern, P. E., & De Nisco, N. J. (2020). Advances in understanding the human urinary microbiome and its potential role in urinary tract infection. *Journal of American Society for Microbiology*, 11(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.00218-20>
- [10] Kenneally, C., Murphy, C. P., Sleator, R. D., & Culligan, E. P. (2022). The urinary microbiome and biological therapeutics: Novel therapies for urinary tract infections. *Microbiological Research*, 259, 127010. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127010>

- [11] Kaur, R., & Kaur, R. (2021). Symptoms, risk factors, diagnosis and treatment of urinary tract infections. *Postgraduate Medical Journal*, 97(1154), 803–812. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2020-139090>
- [12] Öztürk, R., & Murt, A. (2020). Epidemiology of urological infections: a global burden. *World Journal of Urology*, 38(11), 2669–2679. <https://doi.org/10.1007/s00345-019-03071-4>
- [13] Zare, M., Vehreschild, M. J. G. T., & Wagenlehner, F. (2022). Management of uncomplicated recurrent urinary tract infections. *BJU International*, 129(6), 668–678. <https://doi.org/10.1111/bju.15630>
- [14] Odabasi, Z., & Mert, A. (2020). Candida urinary tract infections in adults. *World Journal of Urology*, 38(11), 2699–2707. <https://doi.org/10.1007/s00345-019-02991-5>
- [15] Dias, V. (2020). Candida species in the urinary tract: Is it a fungal infection or not? *Future Microbiology*, 15(2), 81–83. <https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0262>
- [16] de Cássia Orlandi Sardi, J., Silva, D. R., Anibal, P. C., de Campos Baldin, J. J. C. M., Ramalho, S. R., Rosalen, P. L., Macedo, M. L. R., & Hofling, J. F. (2021). Vulvovaginal Candidiasis: Epidemiology and Risk Factors, Pathogenesis, Resistance, and New Therapeutic Options. *Current Fungal Infection Reports*, 15(1), 32–40. <https://doi.org/10.1007/s12281-021-00415-9>
- [17] Saraf, V. S., Sheikh, S. A., Ahmad, A., Gillevet, P. M., Bokhari, H., & Javed, S. (2021). Vaginal microbiome: normalcy vs dysbiosis. *Archives of Microbiology*, 203(7), 3793–3802. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02414-3>
- [18] Kalia, N., Singh, J., & Kaur, M. (2020). Microbiota in vaginal health and pathogenesis of recurrent vulvovaginal infections: A critical review. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 19(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12941-020-0347-4>
- [19] Czechowicz, P., Nowicka, J., & Gościński, G. (2022). Virulence Factors of Candida spp. and Host Immune Response Important in the Pathogenesis of Vulvovaginal Candidiasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11). <https://doi.org/10.3390/ijms23115895>
- [20] Mtibaa, L., Fakhfakh, N., Kallel, A., Belhadj, S., Belhaj Salah, N., Bada, N., & Kallel, K. (2017). Vulvovaginal candidiasis: Etiology, symptomatology and risk factors. *Journal de Mycologie Medicale*, 27(2), 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.01.003>
- [21] Zeng, X., Zhang, Y., Zhang, T., Xu, H., & An, R. (2018). Risk Factors of Vulvovaginal Candidiasis among Women of Reproductive Age in Xi'an: A Cross-Sectional Study. *BioMed Research International*. (1):1-9. <https://doi.org/10.1155/2018/9703754>
- [22] Dabas, P. S. (2013). An approach to etiology, diagnosis and management of different types of candidiasis. *Journal of Yeast and Fungal Research*, 4(6), 63–74.

<https://doi.org/10.5897/JYFR2013.0113>

- [23] He, Z., Su, C., Bi, Y., Cheng, Y., Lei, D., & Wang, F. (2021). Evaluation of a novel laboratory candiduria screening protocol in the intensive care unit. *Infection and Drug Resistance*, 14, 489–496. <https://doi.org/10.2147/IDR.S289885>
- [24] Anggraeni, D., Dwi Endraswari, P., Rusli, M., & Pohan Kawilarang, A. (2022). Epidemiology and Risk Factors for Candiduria in Hospitalized Patients at Dr. Soetomo Hospital, Surabaya, Indonesia. *International Journal of Research Publications*, 115(1), 424–433. <https://doi.org/10.47119/ijrp10011511220224353>
- [25] Gharanfoli, A., Mahmoudi, E., Torabizadeh, R., Katiraii, F., & Faraji, S. (2019). Isolation, characterization, and molecular identification of *Candida* species from urinary tract infections. *Current Medical Mycology*, 5(2), 33–36. <https://doi.org/10.18502/cmm.5.2.1159>
- [26] Hollenbach, E. (2008). To treat or not to treat - Critically ill patients with candiduria. *Mycoses*, 51(2), 12–24. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2008.01570.x>
- [27] Aroca, J. J., Martínez, P. R., Esteban, L. M. M., González, A. M. F., García-Arata, I., & Menchero, S. P. (2020). Epidemiology and etiology of vulvovaginal candidiasis in spanish and immigrants' women in fuenlabrada (madrid). *Revista Espanola de Quimioterapia*, 33(3), 187–192. <https://doi.org/10.37201/req/099.2019>
- [28] Gharanfoli, A., Mahmoudi, E., Torabizadeh, R., Katiraii, F., & Faraji, S. (2019). Isolation, characterization, and molecular identification of *Candida* species from urinary tract infections. *Current Medical Mycology*, 5(2), 33–36. <https://doi.org/10.18502/cmm.5.2.1159>
- [29] Sobel, J. D., & Sobel, R. (2018). Current treatment options for vulvovaginal candidiasis caused by azole-resistant *Candida* species. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 19(9), 971–977. <https://doi.org/10.1080/14656566.2018.1476490>
- [30] Satora, M., Grunwald, A., Zaremba, B., Frankowska, K., Żak, K., Tarkowski, R., & Kułak, K. (2023). Treatment of Vulvovaginal Candidiasis—An Overview of Guidelines and the Latest Treatment Methods. *Journal of Clinical Medicine*, 12(16). <https://doi.org/10.3390/jcm12165376>
- [31] Sardi, J. C. O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M., & Mendes Giannini, M. J. S. (2013). *Candida* species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology*, 62(PART1), 10–24. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.045054-0>
- [32] Ciurea, C. N., Kosovski, I. B., Mare, A. D., Toma, F., Pinteá-Simon, I. A., & Man, A. (2020). *Candida* and candidiasis—opportunism versus pathogenicity: A review of the virulence traits. *Microorganisms*, 8(6), 1–17. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060857>

- [33] Li, X., Hou, Y., Yue, L., Liu, S., Du, J., & Sun, S. (2015). Potential targets for antifungal drug discovery based on growth and virulence in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(10), 5885–5891. <https://doi.org/10.1128/AAC.00726-15>
- [34] Dadar, M., Tiwari, R., Karthik, K., Chakraborty, S., Shahali, Y., & Dhama, K. (2018). *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. *Microbial Pathogenesis*, 117(December 2017), 128–138. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.028>
- [35] Pereira, R., dos Santos Fontenelle, R. O., de Brito, E. H. S., & de Moraes, S. M. (2021). Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 131(1), 11–22. <https://doi.org/10.1111/jam.14949>
- [36] Lopes, J. P., & Lionakis, M. S. (2022). Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Virulence*, 13(1), 89–121. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.2019950>
- [37] Pires, R. H., dos Santos, J. M., Zaia, J. E., Martins, C. H. G., & Mendes-Giannini, M. J. S. (2011). *Candida parapsilosis* complex water isolates from a haemodialysis unit: Biofilm production and in vitro evaluation of the use of clinical antifungals. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(6), 646–654. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000600002>
- [38] Tóth, R., Nosek, J., Mora-Montes, H. M., Gabaldon, T., Bliss, J. M., Nosanchuk, J. D., Turner, S. A., Butler, G., Vágvölgyi, C., & Gácsér, A. (2019). *Candida parapsilosis*: From genes to the bedside. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(2). <https://doi.org/10.1128/CMR.00111-18>
- [39] Branco, J., Miranda, I. M., & Rodrigues, G. (2023). *Candida parapsilosis* Virulence and Antifungal Resistance Mechanisms : A Comprehensive Review of Key Determinants. *Fungi*, 9, 1–15. <https://doi.org/10.3390/jof9010080>
- [40] Dorko, E., Baranová, Z., Jenča, A., Kizek, P., Pilipčinec, E., & Tkáčiková, L. (2005). Diabetes mellitus and candidiasis. *Folia Microbiologica*, 50(3), 255–261. <https://doi.org/10.1007/BF02931574>
- [41] Takashima, M., & Sugita, T. (2022). Taxonomy of Pathogenic Yeasts *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, and *Trichosporon*. *Medical Mycology Journal*, 63(4), 119–132. <https://doi.org/10.3314/mmj.22.004>
- [42] Yan, W., Gao, H., Qian, X., Jiang, Y., Zhou, J., Dong, W., Xin, F., Zhang, W., & Jiang, M. (2021). Biotechnological applications of the non-conventional yeast *Meyerozyma guilliermondii*. *Biotechnology Advances*, 46(August 2020), 107674. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107674>
- [43] Hirayama, T., Miyazaki, T., Yamagishi, Y., Mikamo, H., Ueda, T., Nakajima, K., Takesue, Y., Higashi, Y., Yamamoto, Y., Kimura, M., Araoka, H., Taniguchi, S., Fukuda, Y., Matsuo, Y.,

- Furutani, A., Yamashita, K., Takazono, T., Saijo, T., Shimamura, S., ... Mukaea, H. (2018). Clinical and microbiological characteristics of candida guilliermondii and candida fermentati. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(6), 1–9. <https://doi.org/10.1128/AAC.02528-17>
- [44] Is, C., Marcos-zambrano, L. J., Puig-asensio, M., & Pérez-garcía, F. (2017). Characterized by High Antifungal Resistance but Low Mortality in 22 Cases of Candidemia. *Journal of American Society for Microbiology*, 61(7), 1–10. <https://doi.org/doi.org/10.1128/AAC.00099-17>
- [45] Kreger-van Rij, N. J. W. (1965). Candida ciferrii, a new yeast species. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, 26(1), 49–52. <https://doi.org/10.1007/BF02098589>
- [46] Cosio, T., Pica, F., Fontana, C., Pistoia, E. S., Favaro, M., Valsecchi, I., Zarabian, N., Campione, E., Botterel, F., & Gaziano, R. (2024). Stephanoascus ciferrii Complex: The Current State of Infections and Drug Resistance in Humans. *Journal of Fungi*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/jof10040294>
- [47] Furman, R. M., & Ahearn, D. G. (1983). Candida ciferrii and Candida chiropterorum isolated from clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 18(5), 1252–1255. <https://doi.org/10.1128/jcm.18.5.1252-1255.1983>
- [48] Gunsilius, E., Lass-Flörl, C., Kähler, C. M., Gastl, G., & Petzer, A. L. (2001). Candida ciferrii, a new fluconazole-resistant yeast causing systemic mycosis in immunocompromised patients. *Annals of Hematology*, 80(3), 178–179. <https://doi.org/10.1007/s002770000252>
- [49] Bansal, P., Thakar, M., Kumar, R., & Loomba, P. (2022). Postpartum Endogenous Endophthalmitis in a Young Immunocompetent Female by a Rare Fungus Candida ciferrii. *Ocular Immunology and Inflammation*, 30(7–8), 2043–2046. <https://doi.org/10.1080/09273948.2021.1957125>
- [50] de Gentile, L., Bouchara, J. P., Le Clec'h, C., Cimon, B., Symoens, F., & Chabasse, D. (1995). Prevalence of Candida ciferrii in elderly patients with trophic disorders of the legs. *Mycopathologia*, 131(2), 99–102. <https://doi.org/10.1007/BF01102886>
- [51] Takashima, M., & Sugita, T. (2022). Taxonomy of Pathogenic Yeasts *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, and *Trichosporon*. *Medical Mycology Journal*, 63(4), 119–132. <https://doi.org/10.3314/mmj.22.004>
- [52] Rodrigues, C. F., Silva, S., & Henriques, M. (2014). Candida glabrata: A review of its features and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 33(5), 673–688. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-2009-3>
- [53] Glöckner, A., & Cornely, O. A. (2015). Candida glabrata - unique features and challenges in the clinical management of invasive infections. *Mycoses*, 58(8), 445–450. <https://doi.org/10.1111/myc.12348>

- [54] Pappas, P. G., Lionakis, M. S., Arendrup, M. C., Ostrosky-Zeichner, L., & Kullberg, B. J. (2018). Invasive candidiasis. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(May), 1–20. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.26>
- [55] Duggan, S., & Usher, J. (2023). *Candida glabrata*: A powerhouse of resistance. *PLoS Pathogens*, 19(10 OCTOBER), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011651>
- [56] Hacıoglu, M., Guzel, C. B., Savage, P. B., & Tan, A. S. B. (2019). Antifungal susceptibilities, in vitro production of virulence factors and activities of ceragenins against *Candida* spp. isolated from vulvovaginal candidiasis. *Medical Mycology*, 57(3), 291–299. <https://doi.org/10.1093/mmy/myy023>
- [57] Talapko, J., Juzbašić, M., Matijević, T., Pustijanac, E., Bekić, S., Kotris, I., & Škrlec, I. (2021). *Candida albicans*—the virulence factors and clinical manifestations of infection. *Journal of Fungi*, 7(2), 1–19. <https://doi.org/10.3390/jof7020079>
- [58] Lopes, J. P., & Lionakis, M. S. (2022). Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Virulence*, 13(1), 89–121. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.2019950>
- [59] Singh, D. K., Tóth, R., & Gácsér, A. (2020). Mechanisms of Pathogenic *Candida* Species to Evade the Host Complement Attack. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10(94), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00094>
- [60] Höfs, S., Mogavero, S., & Hube, B. (2016). Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. *Journal of Microbiology*, 54(3), 149–169. <https://doi.org/10.1007/s12275-016-5514-0>
- [61] Cavalheiro, M., & Teixeira, M. C. (2018). *Candida* Biofilms: Threats, challenges, and promising strategies. *Frontiers in Medicine*, 5(FEB), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00028>
- [62] Lohse, M. B., Gulati, M., Johnson, A. D., & Nobile, C. J. (2018). Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 16(1), 19–31. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.107>
- [63] Agaronnik, N., Campbell, E. G., Ressalam, J., & Lezzoni, L. (2019). *Candida albicans* Biofilms and Polymicrobial Interactions. *Microbial Pathogenesis*, 12(3), 403–410. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1843400.Candida>
- [64] Zeng, X., Zhang, Y., Zhang, T., Xu, H., & An, R. (2018). Risk Factors of Vulvovaginal Candidiasis among Women of Reproductive Age in Xi'an: A Cross-Sectional Study. *Bio Med Res Int.* 2018;2018(1):1-9. *BioMed Research International*, 1, 8. <https://doi.org/10.1155/2018/9703754>

- [65] Desai, J. V. (2018). *Candida albicans* hyphae: From growth initiation to invasion. *Journal of Fungi*, 4(1). <https://doi.org/10.3390/jof4010010>
- [66] Chen, H., Zhou, X., Ren, B., & Cheng, L. (2020). The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. *Virulence*, 11(1), 337–348. <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1748930>
- [67] ATCC. (2003). HeLa CCL-2TM. *Product Sheet*. <https://www.atcc.org/products/ccl-2>
- [68] Hansen, M. A., Valentine-King, M., Zoorob, R., Schlueter, M., Matas, J. L., Willis, S. E., Danek, L. C. K., Muldrew, K. L., Zare, M., Hudson, F., Atmar, R. L., Chou, A., Trautner, B. W., & Grigoryan, L. (2022). Prevalence and predictors of urine culture contamination in primary care: A cross-sectional study. *International Journal of Nursing Studies*, 134, 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.ijnurstu.2022.104325>
- [69] Fungal Infection Trust Organization. (2020). How Common are Fungal Diseases? <https://fungalinfectiontrust.org/wp-content/uploads/2021/01/How-Common-are-Fungal-Diseases-Nov20.pdf>
- [70] Gharaghani, M., Taghipour, S., Halvaezadeh, M., & Mahmoudabadi, A. Z. (2018). Candiduria; a review article with specific data from Iran. *Turkish Journal of Urology*, 44(6), 445–452. <https://doi.org/10.5152/tud.2018.54069>
- [71] Santana, M. M. P. de, Hoffmann-Santos, H. D., Dias, L. B., Tadano, T., Karhawi, A. S. K., Dutra, V., Cândido, S. L., & Hahn, R. C. (2019). Epidemiological profile of patients hospitalized with candiduria in the Central-Western region of Brazil. *Revista Iberoamericana de Micologia*, 36(4), 175–180. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2019.04.006>
- [72] Disha, T., & Haque, F. (2022). Prevalence and Risk Factors of Vulvovaginal Candidosis during Pregnancy: A Review. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/6195712>
- [73] Hashemi, S. E., Shokohi, T., Abastabar, M., Aslani, N., Ghadamzadeh, M., & Haghani, I. (2019). Species distribution and susceptibility profiles of *Candida* species isolated from vulvovaginal candidiasis, emergence of *C. Lusitaniae*. *Current Medical Mycology*, 5(4), 26–34. <https://doi.org/10.18502/cmm.5.4.2062>
- [74] Venugopal, D., Husain, K., Mustafa, S. A., & Sabeen, S. (2021). Epidemiology, risk factors and antimicrobial profile of Vulvovaginal Candidiasis (VVC): A study among women in the central region of Saudi Arabia. *Journal of Medical Mycology*, 31(2), 101049. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2020.101049>
- [75] Bilal, H., Shafiq, M., Hou, B., Islam, R., Khan, M. N., Khan, R. U., & Zeng, Y. (2022). Distribution and antifungal susceptibility pattern of *Candida* species from mainland China: A

systematic analysis. *Virulence*, 13(1), 1573–1589.
<https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2123325>

[76] Lima, G. M. E., Nunes, M. de O., Chang, M. R., Tsujisaki, R. A. de S., Nunes, J. de O., Taira, C. L., Thomaz, D. Y., Del Negro, G. M. B., Mendes, R. P., & Paniago, A. M. M. (2017). Identification and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from the urine of patients in a university hospital in Brazil. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 59(August).
<https://doi.org/10.1590/S1678-9946201759075>

[77] Pappas, P. G., Kauffman, C. A., Andes, D. R., Clancy, C. J., Marr, K. A., Ostrosky-Zeichner, L., Reboli, A. C., Schuster, M. G., Vazquez, J. A., Walsh, T. J., Zaoutis, T. E., & Sobel, J. D. (2015). Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 62(4), e1–e50.
<https://doi.org/10.1093/cid/civ933>

[78] Crowley, P. D., & Gallagher, H. C. (2014). Clotrimazole as a pharmaceutical: Past, present and future. *Journal of Applied Microbiology*, 117(3), 611–617. <https://doi.org/10.1111/jam.12554>

[79] Mendling, W., Shazly, M. A. El, & Zhang, L. (2020). Clotrimazole for vulvovaginal candidosis: More than 45 years of clinical experience. *Pharmaceuticals*, 13(10), 1–26.
<https://doi.org/10.3390/ph13100274>

[80] Borman, A. M., Muller, J., Walsh-Quantick, J., Szekely, A., Patterson, Z., Palmer, M. D., Fraser, M., & Johnson, E. M. (2019). Fluconazole resistance in isolates of uncommon pathogenic yeast species from the United Kingdom. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(8), 1–12.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00211-19>

[81] Sadeghi, G., Ebrahimi-Rad, M., Mousavi, S. F., Shams-Ghahfarokhi, M., & Razzaghi-Abyaneh, M. (2018). Emergence of non-*Candida albicans* species: Epidemiology, phylogeny and fluconazole susceptibility profile. *Journal de Mycologie Medicale*, 28(1), 51–58.
<https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.12.008>

[82] Maraki, S., Mavromanolaki, V. E., Stafylaki, D., Nioti, E., Hamilos, G., & Kasimati, A. (2019). Epidemiology and antifungal susceptibility patterns of *Candida* isolates from Greek women with vulvovaginal candidiasis. *Mycoses*, 62(8), 692–697. <https://doi.org/10.1111/myc.12946>

[83] Fernandes, Â., Azevedo, N., Valente, A., Dias, M., Gomes, A., Nogueira-Silva, C., Henriques, M., Silva, S., & Gonçalves, B. (2022). Vulvovaginal candidiasis and asymptomatic vaginal colonization in Portugal: Epidemiology, risk factors and antifungal pattern. *Medical Mycology*, 60(5), 1–11. <https://doi.org/10.1093/mmy/myac029>

[84] De Francesco, M. A., Piccinelli, G., Gelmi, M., Gargiulo, F., Ravizzola, G., Pinsi, G., Peroni, L., Bonfanti, C., & Caruso, A. (2017). Invasive Candidiasis in Brescia, Italy: Analysis of Species Distribution and Antifungal Susceptibilities During Seven Years. *Mycopathologia*, 182(9–10),

897–905. <https://doi.org/10.1007/s11046-017-0155-3>

[85] Rosato, A., Catalano, A., Carocci, A., Carrieri, A., Carone, A., Caggiano, G., Franchini, C., Corbo, F., & Montagna, M. T. (2016). In vitro interactions between anidulafungin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on biofilms of *Candida* spp. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 24(5), 1002–1005. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.01.026>

[86] Frej-Madrzak, M., Golec, S., Włodarczyk, K., Choroszy-Król, I., & Nawrot, U. (2021). Susceptibility to clotrimazole of *Candida* spp. Isolated from the genitourinary system—a single center study. *Pathogens*, 10(9), 1–12. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091142>

[87] Zhou, X., Li, T., Fan, S., Zhu, Y., Liu, X., Guo, X., & Liang, Y. (2016). The efficacy and safety of clotrimazole vaginal tablet vs. oral fluconazole in treating severe vulvovaginal candidiasis. *Mycoses*, 59(7), 419–428. <https://doi.org/10.1111/myc.12485>

[88] Marak, M. B., & Dhanashree, B. (2018). Antifungal susceptibility and biofilm production of *Candida* spp. Isolated from clinical samples. *International Journal of Microbiology*, 2018, 6–11. <https://doi.org/10.1155/2018/7495218>

[89] Kamini, P., Premamalini, T., Karthika, K., & Bavadharani, S. (2022). Antifungal susceptibility profile and biofilm production of *Candida* spp. isolated from catheterised patients with urinary tract infection. *Journal of The Academy of Clinical Microbiologists*, 24(2), 76. https://doi.org/10.4103/jacm.jacm_12_22

[90] McKloud, E., Delaney, C., Sherry, L., Kean, R., Williams, S., Metcalfe, R., Thomas, R., Richardson, R., Gerasimidis, K., Nile, C. J., Williams, C., & Ramage, G. (2021). Recurrent Vulvovaginal Candidiasis: a Dynamic Interkingdom Biofilm Disease of *Candida* and *Lactobacillus*. *MSystems*, 6(4). <https://doi.org/10.1128/mSystems.00622-21>

[91] Laari, J. L., Anab, M., Jabong, D. P., Abdulai, K., & Alhassan, A. R. (2022). Maternal Age and Stage of Pregnancy as Determinants of UTI in Pregnancy: A Case of Tamale, Ghana. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/3616028>

[92] Citiulo, F., Jablonowski, N., Fo, S., Dalle, F., Wa, B., Schaller, M., Wilson, D., & Hube, B. (2012). *Candida albicans*-Epithelial Interactions: Dissecting the Roles of Active Penetration, Induced Endocytosis and Host Factors on the Infection Process. *PLoS ONE*, 7(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036952>

[93] Trevijano-contador, N., Rueda, C., & Zaragoza, O. (2016). Fungal morphogenetic changes inside the mammalian host. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 57, 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.04.008>

Anexo I - Parecer da comissão de ética do CHUCB



IMPRESSO

Parecer da Comissão de Ética para a Saúde

Código: CHUCB.IMP.COMET.01

Edição: 5

Revisão: 1

Parecer nº: 02/2024	Data: 2024/01/10
Assunto: Estudo nº 81/2023 – “Avaliação do potencial virulento de leveduras causadoras de infeção urinária e sua relação com a candidose vulvovaginal”	

Membros da CE do CHUCB:

Prof. Doutor Manuel Passos Morgado
(Presidente, Farmacêutico)

Dra. Ana Paula Torgal Carreira
(Vice-Presidente, Assistente Social)

Dr. Luís Manuel Ribeiro
(Médico)

Enf. Maria Gabriela Ramalinho
(Enfermeira)

Dra. Maria Teresa Bordalo Santos
(Psicóloga)

Dr. Luís Manuel Carreira Fiadeiro
(Jurista)

Dr. António Luciano Costa
(Teólogo)

Exma. Senhora Investigadora
Filipa Daniela Oliveira Castro

A Comissão de Ética do Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira, em reunião realizada em 2024/01/10 deliberou emitir parecer relativamente à realização do Estudo nº 81/2023 – “Avaliação do potencial virulento de leveduras causadoras de infeção urinária e sua relação com a candidose vulvovaginal”

Membros da CES do CHUCB presentes:

Prof. Doutor Manuel Passos Morgado

Dra. Ana Paula Torgal Carreira

Dr. Luís Manuel Carreira Fiadeiro

Dr. António Luciano Costa

Parecer:

Apreciado o projeto do estudo foi decidido por unanimidade dos votantes emitir parecer favorável à sua realização.

Este parecer não dispensa eventuais requisitos ou procedimentos por parte do Responsável pelo Acesso à Informação (RAI) ou do Encarregado de Proteção de Dados (EPD) desta instituição, no âmbito do previsto no Regulamento Geral sobre a Proteção de Dados (RGPD) ou noutra legislação aplicável quanto a acesso, tratamento e proteção de dados.

A realização do estudo carece da necessária autorização por parte do Ex.mo Conselho de Administração do CHUCB e no seu decurso pode ser sujeito a auditorias.

O Presidente da Comissão de Ética


(Prof. Doutor Manuel Passos Morgado)

