

Impacto dos estrogénios na incidência de candidose vulvovaginal

Letícia Almeida Miguel

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia
(2^o ciclo de estudos)

Orientadora: Prof. Doutora Joana Rolo
Co-orientadoras: Prof. Doutora Sara Correia;
Prof. Doutora Ana Palmeira Oliveira

Novembro de 2021

Folha em branco

Agradecimentos

“Se quer ir rápido, vá sozinho. Se quer ir longe, vá acompanhado.” Um provérbio africano que nunca fez tanto sentido.

Quero agradecer à professora Joana por todo o conhecimento que me passou e por toda a positividade que sempre teve.

Às professoras Sara e Ana Palmeira Oliveira por toda a ajuda, orientação e acompanhamento ao longo deste ano.

Ao professor José Martinez por toda a ajuda, opiniões e críticas construtivas que foi transmitindo.

Aos mestres Carlos e Ana por todo o tempo que dispensaram para me aconselharem, acompanharem e, acima de tudo, acalmarem nos dias menos bons.

Aos meus colegas de laboratório, Paula, Neila e em especial ao Miguel, mais do que um colega, um amigo que certamente levarei para a vida.

À minha família que sempre acreditou e apoiou.

Ao Fábio, sempre presente, nos dias bons e em especial nos dias em que tudo parecia um pesadelo.

Obrigada a todos.

Folha em branco

Resumo

Os estrogénios são hormonas sexuais esteroides que, nas mulheres, são responsáveis pelo desenvolvimento do sistema reprodutivo. Existem vários tipos de estrogénios com diferentes funções. A estrona (E1) é considerada um estrogénio fraco e existe numa concentração inferior à do estradiol (E2) durante grande parte da vida da mulher, que é o tipo mais ativo e está relacionado com o ciclo menstrual. Durante a menopausa, ocorre uma diminuição dos níveis de E2, responsável por várias mudanças no organismo. Por exemplo, tem sido relacionado com uma diminuição das infeções vulvovaginais causadas por *Candida albicans*.

Este estudo visou estudar a relação entre a concentração de estrogénios e alterações no comportamento destes microrganismos, que poderiam contribuir para a sua patogenicidade. Onze estirpes clínicas de *C. albicans* em estudo foram submetidas a vários testes na presença de E1 ou E2: ensaio mínimo de concentração inibitória, ensaio de adesão *in-vitro*, ensaio de formação de tubo germinativo e infeção das células HeLa (derivadas de um carcinoma cervical) e células Hec-1-A (do endométrio).

Tanto a estrona como o estradiol não influenciaram o crescimento das estirpes de *C. albicans*. No entanto, E1 provocou uma maior adesão *in-vitro*, e uma maior concentração estrogénica conduziu a um aumento da formação de tubo germinativo. Além disso, houve resposta à estimulação hormonal no contexto da infeção, particularmente com as células Hec-1-A.

Em conclusão, observou-se uma interação entre os estrogénios e *C. albicans*, relacionada com fatores de virulência, em que a E1 teve mais impacto do que a E2.

Palavras-chave

Candida albicans; Candidose vulvovaginal; Estradiol; Estrona; fatores de virulência.

Folha em branco

Abstract

Estrogens are sex steroid hormones that, in women, are responsible for the development of the reproductive system. There are several types of estrogens with different functions. Estrone (E1) is considered a weak estrogen and exists at a lower concentration than estradiol (E2), which is the most active type and is related to the menstrual cycle. During menopause, a decrease of E2 levels occurs, which has several impacts. For example, it has been related with a decrease in vulvovaginal infections caused by *Candida albicans*.

This study aimed to investigate the relationship between the concentration of estrogens and alterations in *C. albicans* behaviour, that could contribute to its pathogenesis. Eleven clinical *C. albicans* strains under study were subjected to several tests in the presence of E1 or E2: minimum inhibitory concentration test, *in-vitro* adhesion test, germinative tube formation test, and infection of HeLa cells (derived from a cervical carcinoma) and Hec-1-A cells (from the endometrium).

Both E1 and E2 did not impair the growth of *C. albicans* strains. However, E1 prompted a greater *in-vitro* adhesion, and an increased estrogenic concentration lead to an increase in germ tube formation. In addition, there was a high response to hormones stimulation in the context of infection, particularly with Hec-1-A cells.

In conclusion, it was observed, an interaction between estrogens and *C. albicans* strains, related to the phenotypic expression of virulence factors and not their viability in which E1 had more impact than E2.

Keywords

Candida albicans; Estradiol; Estrone; virulence factors; vulvovaginal candidosis;

Folha em branco

Índice

Resumo.....	v
Lista de Tabelas.....	xv
Lista de Acrónimos.....	xvii
Capítulo 1.....	1
Introdução.....	1
1.1. Fases biológicas na vida da mulher.....	1
1.2 Estrogénios e o seu impacto.....	2
1.3 Recetores de estrogénios.....	5
1.4 Microbiota vaginal.....	7
1.5 Candidose vulvovaginal.....	8
1.5.1 <i>Candida albicans</i>	9
1.5.1.1 Relação entre estrogénios e <i>Candida albicans</i>	10
1.5.1.1.1 Tubo germinativo.....	10
1.5.1.1.2 Biofilme.....	11
1.5.1.1.3 Adesão celular.....	12
Capítulo 2.....	13
Objetivos.....	13
Capítulo 3.....	14
Materiais e métodos.....	14
3.1. Preparação das hormonas.....	14
3.2. Efeitos das hormonas em células planctónicas (CMI).....	14
3.2.1. Preparação dos meios.....	14
3.2.2. Ensaio.....	15
3.3. Efeito das hormonas na formação do tubo germinativo.....	16
3.3.1. Preparação de meio e suspensões.....	16
3.3.2. Ensaio.....	16
3.4. Efeito das hormonas na formação de biofilmes.....	18
3.4.1. Ensaio.....	18
3.5. Ensaios celulares.....	21
Os meios foram preparados de acordo com as indicações do fornecedor.....	21

3.5.1 Manutenção da linha celular e cultura de células.....	21
3.5.1.1. Adição de estímulo	23
3.5.1.2. Infecção	23
3.5.2 Extração de ARNt	24
3.5.2.1 Quantificação de ARNt.....	25
3.5.2.2 Síntese de ADN complementar (ADNc)	25
3.5.2.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional para 18S.....	26
3.5.2.4 Eletroforese	27
3.5.3 Utilização de primers específicos	27
3.6 Análise estatística.....	28
Capítulo 4	29
Resultados	29
4.1 Concentração mínima inibitória (CMI) de estrona e estradiol em células planctónicas de <i>Candida</i> spp	29
4.2 Formação de biofilmes de estirpes de <i>Candida albicans</i> quando testadas com estrogénios	39
4.3 Mudanças na capacidade de estirpes de <i>Candida albicans</i> na formação do tubo germinativo na presença de estrona e estradiol.....	41
4.4 Gel de eletroforese obtido após realização de PCR convencional 18S.....	44
4.5 Expressão dos recetores de estrogénios pelas células Hec-1-A e HeLa	45
4.6 Variações no nível de infecção em linhas celulares testadas com estrogénios.....	47
4.7 Análise estatística.....	49
Capítulo 5	50
Discussão e Conclusão.....	50
Capítulo 6	55
Perspetivas futuras	55
Anexo I.....	1
Bibliografia	1

Folha em branco

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura de estrogénios.....	2
Figura 2 a) Fotografia de uma placa de 96 poços e b) esquema de uma placa de 96 poços	19
Figura 3 Ensaio de concentração mínima inibitória de estrona em estirpes de <i>Candida albicans</i>	30
Figura 4 Valores relativos à viabilidade da estirpe ATCC100231 testada com estrona ..	31
Figura 5 Valores relativos à viabilidade da estirpe 57A testada com estrona	31
Figura 6 Valores relativos à viabilidade das estirpes a) 66A e b) 74 testadas com estrona	31
Figura 7 Valores relativos à viabilidade das estirpes a) 84 b) 98 c) 142 d)156 testadas com estrona.....	32
Figura 8 Valores relativos à viabilidade das estirpes a) 172 b) 185 e c) 214 testadas com estrona	33
Figura 9 Ensaio de concentração mínima inibitória de estradiol em estirpes de <i>Candida albicans</i>	35
Figura 10 Valores relativos à viabilidade da estirpe ATCC100231 testada com estradiol	35
Figura 11 Valores relativos à viabilidade da estirpe 57A testada com estradiol	36
Figura 12 Valores relativos à viabilidade da estirpe a) 66A e b) 74 testadas com estradiol	36
Figura 13 Valores relativos à viabilidade das estirpes a) 84 b) 98 c) 142 d) 156 e) 172 f) 185 g) 214 testadas com estradiol	37
Figura 14 Ensaio de formação de biofilmes em várias condições hormonais	39
Figura 15 Valores relativos à formação de biofilme por estirpes testadas.....	40
Figura 16 Ensaio de formação do tubo germinativo aplicado às estirpes ATCC100231, 57A e 74 testadas com: a) estrona; b) estradiol	41
Figura 17 Valores relativos à formação de tubo germinativo em estirpes testadas com a) estrona b) estradiol	42
Figura 18 PCR relativo à amplificação do gene <i>housekeeping</i> 18S às linhas celulares HeLa e Hec-1-A.....	44
Figura 19 Gel de amplificação dos recetores da linha celular Hec-1-A com diferentes primers.....	45
Figura 20 Gel de amplificação dos recetores da linha celular HeLa com diferentes primers.....	46

Figura 21 Ensaio de infeçãõ realizados com linhas celulares	47
Figura 22 Valores relativos aos nívéis de infeçãõ em estirpes testadas com estrogénios em linhas celulares	48

Folha em branco

Lista de Tabelas

Tabela 1	Condições de ensaio para o teste da formação do tubo germinativo.....	17
Tabela 2	Condições de ensaio para o teste da formação de biofilme	18
Tabela 3	Ensaio de infecção em linhas celulares.....	23
Tabela 4	Volume de água DEPC a adicionar a cada amostra	25
Tabela 5	Quantificação de ARNt presente no nas células HeLa e Hec-1-A.....	43
Tabela 6	Resultados da análise estatística.....	49
Tabela 7	Informações relativas às estirpes estudadas	1

Folha em branco

Lista de Acrónimos

FSH	Hormona folículo-estimulante
LH	Hormona Luteinizante
GnRH	Hormona libertadora de gonadotropina
DHA	Desidroepiandrosterona
SHBG	Globulina de ligação das hormonas sexuais <i>Sexual Hormone binding globulin</i>
CYP11A	Enzima de clivagem de cadeia lateral do colesterol
E1	Estrona
E2	Estradiol
E3	Estriol
E4	Estetrol
ERα	Recetor de estrogénio alfa
ERβ	Recetor de estrogénio beta
GPR30/GPER	Recetor de estrogénio acoplado à proteína G
ALS	Sequência- tipo aglutinina
SAP	Aspartato proteinase secretada
TAC1	Pré Protaquiquinina 1
CDR1	Proteína 1 relacionada à degeneração cerebelar
CDR2	Proteína 2 relacionada à degeneração cerebelar
P14P5K	Fosfatidilinositol-4-fosfato-5-quinase
FAK	Cinase de adesão focal
NR3A	Subfamília 3 do recetor nuclear
ARN	Ácido ribonucleico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido ribonucleico complementar
RNase H	Ribonuclease H
SDA	Agar dextrose de Sabouraud
YPD	Dextrose peptona extrato de levedura
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco

DEPC	Dicarbonato de dietilo
PBS	Tampão fosfato salino
CMI	Concentração mínima inibitória
NaCl	Cloreto de sódio
MgCl₂	Cloreto de magnésio
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
Rcf/FCR	Relative centrifugal force/Força centrífuga relativa
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RT-PCR	Reação em cadeia de polimerase em tempo real
CP	Controlo positivo
V	Volume
C	Concentração
ng	Nanograma
mg	Miligrama
μL	Microlitro
pg	Picograma

Folha em branco

Capítulo 1

Introdução

1.1. Fases biológicas na vida da mulher

Ao longo da vida, a mulher passa por várias fases reprodutivas (Wise and Laughlin-Tommaso, 2001)). A menarca inicia este ciclo, sendo definida como a primeira menstruação e tende a ocorrer, nos países desenvolvidos, entre os 10 e os 16 anos (Rees 1995).

Segue-se a idade fértil, dos 15 aos 44 anos, em que a mulher se encontra na fase reprodutiva (Hutchesson et al., 2020).

Após estas duas importantes etapas, a mulher entra na fase do climatério, dividido em três fases: pré-menopausa, perimenopausa e pós-menopausa. A pré-menopausa inicia-se após os 40 anos e observa-se uma diminuição da fertilidade, mantendo-se, no entanto, a regularidade dos ciclos menstruais tidos durante a idade fértil. A perimenopausa começa cerca de dois anos antes da última menstruação e pode alongar-se até após um ano, em que se verificam maiores irregularidades dos ciclos e endócrinas. O climatério encerra na pós-menopausa, fase que principia um ano após se conferir a última menstruação. É imediatamente após a perimenopausa que ocorre a menopausa, nome atribuído à última menstruação e que marca o fim da fase reprodutiva (Dall et al., 2021). Um ano após se verificar a amenorreia é feito o historial clínico e dado, por fim, o diagnóstico (Silva 2016).

1.2 Estrogénios e o seu impacto

Dentro da família dos estrogénios 4 são fisiologicamente mais relevantes: estrona (E1), estradiol (E2), estriol (E3) e estetrol (E4) (Alderman and Taylor 2021)

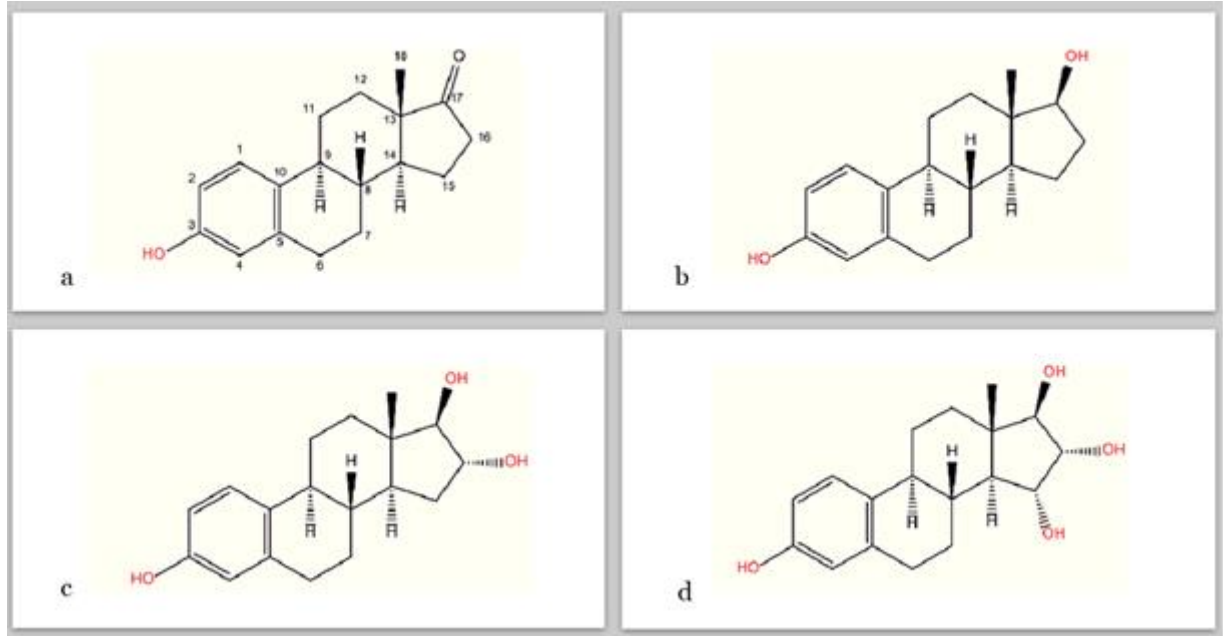


Figura 1. Estrutura de estrogénios. Adaptado de “Alderman and Taylor 2021” a) estrona (E1) b) estradiol (E2) c) Estriol (E3) d) Estetrol (E4).

Todos os estrogénios têm como precursor o colesterol que é, num primeiro passo, convertido em pregnenolona pela enzima CYP11A (enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol). A 3β -hidroxisteróide desidrogenase/ $\Delta 5$ -4 isomerase converte este produto em progesterona, que passa a 17α -OH-progesterona por ação da 17α -hidroxylase (Marques 2017).

Com nova atividade da 17α -hidroxilase sobre a 17α -OH-progesterona obtém-se androstenediona, precursor da estrona, por atuação da aromatase. Também a partir da testosterona através da 17β -hidroxisteróide desidrogenase, origina-se o estradiol por intermédio da aromatase. Esta enzima também permite à estrona converter-se em estradiol (Marques 2017).

Estes estrogénios podem ser obtidos através de outra hormona- a desidroepiandrosterona (DHEA)-, que se encontra em circulação com valores superiores à estrona e ao estradiol. A pregnenolona sob ação da 17α -hidroxylase origina 17α -OH-pregnenolona, e, atuando de novo, origina DHEA que tem como produto androstenediona através da 3β -hidroxisteróide desidrogenase/ $\Delta 5$ -4 isomerase (Marques 2017).

São vários os recetores nucleares de estrogénios, o principal grupo de fatores de transcrição presentes nos eucariotas, que controlam a expressão genómica.

Estes recetores, de forma a manterem a sua estabilidade na ausência de hormonas, encontram-se ligados a proteínas de choque térmico, alterando a sua conformação com a chegada dos estrogénios para poderem estabelecer ligação (Damião, Oliveira, and Rodrigues, 2019).

No organismo humano os recetores estão distribuídos consoante o tipo, que no caso dos esteroides se dividem em α ou β . Os primeiros podemos encontrá-los em células endoteliais vasculares, na mama ou até mesmo no endométrio. Já os recetores de estrogénio β estão presentes nos ovários, nos vasos sanguíneos, e, entre outros, no útero e na próstata. Havendo ligação de estrogénios aos recetores a resposta fisiológica é desencadeada por uma cascata de sinalização (Pires 2016).

São várias as funções que lhes são associadas entre as quais ação cardioprotetora e um importante papel na integridade óssea (Pires 2016). Enquanto hormonas sexuais femininas, o crescimento do folículo ovariano, manutenção da espessura da vagina e diferenciação do sistema reprodutivo, mas também a síntese de glicogénio que permite a manutenção do pH ácido vaginal próprio da mulher em idade reprodutiva (Marques 2017).

Até à pré-menopausa, inclusive, a síntese estrogénica ocorre principalmente nos ovários, induzida pelas hormonas folículo-estimulante (FSH) e luteinizante (LH) que são libertadas pela pituitária anterior após estimulação pela hormona segregada pelo hipotálamo, a hormona libertadora de gonadotropina (GnRH) (Botelho 2015). Após a menopausa, tende a ocorrer nos tecidos periféricos como pele, tecido adiposo e músculos. Todo este processo do climatério, resultante do esgotamento do património folicular ovariano (Lisboa 2020) e que se reflete na diminuição de estrogénios (hormonas sexuais) secretados pelos ovários (Madalena and Soares 2004) acarreta várias mudanças, tanto físicas como psicológicas, à mulher. Alguns dos sintomas descritos são os distúrbios vasomotores, em que as mulheres relatam episódios de aumento de temperatura corporal e até mesmo suores noturnos e podem ser influenciados, por exemplo, pelo tabagismo ou índice de massa corporal (Silva 2016). Tende a ocorrer aumento de peso corporal e a nível vulvovaginal podem surgir sintomas como prurido, secura e ardor. Ansiedade e depressão são outros dois sintomas muitas vezes reportados.

Nesta fase, os ovários tornam-se menos sensíveis aos estímulos gonadotróficos e a biossíntese de estradiol (E2) e estrona (E1) diminuem, sendo o decréscimo de E2 drástico (de cerca de 80%), tornando-se E1 o principal estrogénio circulante (Ministério da Saúde 2008).

A estrona, cujos valores séricos pré-menopausa variam dos 30 pg/mL aos 300 pg/mL (Ministério da Saúde, 2008), na pós-menopausa, tendo a androstenediona como fonte primordial, os valores podem variar consoante vários fatores, sendo que tanto pode variar dos 7-40pg/mL (Richardson et al. 2020) como atingir valores mais elevados em pessoas obesas, com valores a rondar os 60 a 80 pg/mL (Qureshi et al. 2020). Nas pessoas com 70 anos ou mais, os valores podem facilmente atingir os 48 pg/mL (Davis et al. 2019).

Na pós-menopausa a principal origem de estradiol é através da conversão de testosterona, aproximando-se os valores séricos dos 15 pg/mL, contrastando bastante com os 50 a 300 pg/mL verificados até à pré-menopausa (Qureshi et al. 2020). Produzido nos ovários, liga-se à globulina de ligação das hormonas sexuais (SHBG), responsável pela disponibilização hormonal no organismo e com menor afinidade à albumina. Separa-se da SHBG para penetrar na célula e ligar-se ao recetor (Damião, Oliveira, and Rodrigues, 2019).

A concentração de E₃ é insignificante na pós-menopausa (Richard et al. 2021) mas estudos sugerem que a terapia hormonal com este estrogénio pode ser benéfica nesta fase da vida da mulher. É, contudo, o principal estrogénio durante a gravidez (Ali, Mangold, and Peiris 2017). O estetrol é produzido apenas pelo fígado fetal durante a gravidez (Duijkers et al. 2021).

1.3 Recetores de estrogénios

Naturalmente que, para se desencadear uma resposta à presença de estrogénios, é necessário que as células possuam recetores. A sinalização celular depende tanto do tipo de estrogénio como do recetor- nuclear ou membranar. Pertencendo à subfamília 3 do recetor nuclear (NR3A) encontram-se os recetores de estrogénio α (presentes no núcleo celular, na mitocôndria e retículo endoplasmático) e β (no núcleo celular e mitocôndria) (Gibson and Saunders 2012). Estes são membros de uma superfamília de fatores de transcrição ativados por ligandos (Fan and Li 2018).

Os recetores ER α e ER β derivam dos genes *ERS1* e *ERS2* respetivamente e partilham as mesmas características estruturais. Os recetores nucleares são caracterizados pelos domínios de A a F, em que o domínio A/B (região N-terminal) (AF1) é codificado pelo exão 1 e os exões 2 e 3 codificam o domínio central de ligação ao ADN (DBD) (domínio C), que o distingue dos restantes recetores. Para conferir uma maior flexibilidade à molécula, esta apresenta a região de dobradiça no domínio D, codificada pelo exão 4. Os restantes exões (5, 6, 7 e 8) englobam domínios referentes ao C-terminal que codificam os domínios E e F, domínio de ligação ao ligante (LBD) e domínio AF-2. A região C-terminal é a que contém propriedades de reconhecimento da hormona e que assegura que a resposta fisiológica seja específica e seletiva. Ambos os recetores apresentam 12 hélices com aminoácidos em que a posição da hélice 12 é a responsável pela conexão a ligandos, agonistas ou antagonistas, nos quais a estrona e o estradiol se enquadram como agonistas e é com base nas diferenças do domínio AF1 de cada recetor que a resposta aos estrogénios difere (Gibson and Saunders 2012).

Estes recetores partilham também o mesmo mecanismo no que diz respeito à regulação da atividade transcricional de genes específicos. Encontra-se descrito que os recetores de estrogénio são ativados por ligandos e formam dímeros (que podem ser homo, por exemplo ER α -ER α , ou hétero, por exemplo ER α -ER β). Estes dímeros interagem com elementos de resposta a estrogénios na região promotora do gene (Gibson and Saunders 2012).

Existe, no entanto, um recetor de estrogénio membranar- o GPR30 diretamente ligado à ação dos estrogénios na célula (Levin 2011) que atua em minutos ou até mesmo segundos (Fan and Li 2018).

Estudos sugerem que este recetor de membrana ativado pelo 17- β -estradiol ativa uma via de sinalização (SRC/EGFR/PI3K/Akt/mTOR) que promove a fosforilação da proteína p62. Esta proteína induz a expressão do gene *ESR1*, pois, quando fosforilada compete com o gene pelo complexo KEAP1. Assim, os estrogénios podem levar a uma resposta rápida quando mediados por GPR30 ou, pela expressão de *ESR1*, levar a um efeito genómico (Tsai et al. 2021).

Existem várias isoformas e variações de recetores e a sua resposta irá sempre estar dependente do tipo de células, do tecido e da disponibilidade do ligando (Gibson and Saunders 2012).

Tendo em conta o sistema reprodutor feminino, existem vários tecidos que possuem estes recetores. O útero é constituído por camadas. A camada intermédia, muscular, é denominada miométrio, onde ambos os recetores (α e β) são expressos, contudo, a sua prevalência altera-se ao longo das fases da vida da mulher, por exemplo, na gravidez e no pós-menopausa verifica-se um maior predomínio de $Er\beta$, contrastando com a superioridade de $ER\alpha$ nas outras fases. (Gibson and Saunders 2012).

Células Hec-1-A são células do endométrio, da camada interior do útero, que sofre alterações de acordo com o ciclo menstrual e disponibilidade de estrogénios. A expressão de recetores de estrogénio neste tecido ocorre de forma temporal (Gibson and Saunders 2012).

No que diz respeito às células HeLa, células do colo do útero, encontra-se descrita a expressão dos dois recetores nas células tanto do estroma como nas epiteliais. No entanto, no endotélio vascular cervical apenas está presente $Er\beta$, sendo o recetor α característico do cancro cervical (Gibson and Saunders 2012).

1.4 Microbiota vaginal

O hipostrogenismo que se observa à medida que se transita da fase reprodutora até à fase não reprodutora da mulher tem como consequência a diminuição de bactérias do género *Lactobacillus* na vagina da mulher, que se traduz numa mudança de pH para valores quase neutros (6,5 a 7) (Aguiar 2017) e beneficia microrganismos patogénicos (Leite and Ferreira 2012) alterando a microbiota vaginal.

A microbiota vaginal define-se como sendo o conjunto de microrganismos de um ecossistema e que pode ser influenciada por alguns fatores ambientais e genéticos (Schwiertz, 2016).

Tanto o parto como a amamentação são importantes para a colonização de, principalmente, *Lactobacillus*, (Mendling and Mendling 2016) bactéria gram-positiva produtora de ácido láctico, através da conversão de glicogénio, e que é responsável pelo pH vaginal ácido, entre os 3,8 e 4,4, que protege de infeções (Tomusiak et al. 2015).

Numa mulher em idade fértil é o género *Lactobacillus* que predomina, principalmente a espécie *L. iners*, seguida das espécies *L. crispatus*, *L. jensenii* e *L. gasseri*. Microorganismos como *Listeria*, *Streptococcus* e *Candida albicans* também se encontram num ecossistema vaginal saudável (Aguiar 2017).

A diversidade microbiológica existente na vagina é também devida a polimorfismos genéticos que se traduzem na capacidade do hospedeiro em produzir fatores anti ou pró microbianos (Mendling and Mendling 2016).

Várias doenças podem ser despoletadas por uma anormalidade na microbiota vaginal. Uma delas é a vaginose bacteriana em que bactérias gram-negativas anaeróbias em forma de bastonete e cocos gram-positivos anaeróbios se sobrepõem aos *Lactobacillus*. Está associada a sintomas como corrimento esbranquiçado e odor intenso a peixe podre dependente da espécie *Gardnerella vaginalis*. Já a existência excessiva de *Streptococcus agalactiae* e *Escherichia coli* pode originar vaginite aeróbica (Mendling and Mendling 2016).

Uma outra infeção causada por microrganismos é a conhecida candidose vulvovaginal.

1.5 Candidose vulvovaginal

Candidose vulvovaginal é uma infecção que afeta a vulva e a vagina e é provocada maioritariamente por espécies de *Candida*, entre elas a *C. albicans*, que causa cerca de 80 a 90% de todos os casos registados. Mais raras e de difícil tratamento são as infecções provocadas por *Candida não albicans*, *C. tropicalis* ou *C. glabrata* (Ferracin I., De Oliveira R. 2005).

Esta infecção pode ser considerada não complicada, caso os episódios sejam esporádicos. Estes casos estão mais associados a infecção causada por *Candida albicans*. Se o número de episódios for igual ou superior a quatro por ano é denominada de candidose vulvovaginal recorrente (Inez and Svidzinski 2007). Atinge sobretudo mulheres imunossuprimidas e é causada maioritariamente por espécies de *Candida não albicans* (Bastos A., et al. 2005).

Gravidez, terapia de reposição hormonal e diabetes *mellitus* são fatores que favorecem o aparecimento de candidose devido ao hiperestrogenismo e conseqüente aumento dos níveis de glicogénio, que se traduz num aumento de substrato nutricional. Assim, a competição por nutrientes decresce e a probabilidade do aparecimento de uma infecção aumenta. Também o uso de antibióticos tem o seu efeito pejorativo pois destrói a microbiota bacteriana diminuindo a rivalidade por substâncias nutritivas. Também os hábitos higiénicos e o uso de roupa justa e sintética podem aumentar a possibilidade do desenvolvimento de uma candidose. Alguns dos sintomas mais comuns são prurido, edema e disúria (De Holanda A., et al, 2006).

Encontra-se descrito que após a menopausa a probabilidade de ocorrer uma infecção por *Candida* spp está limitada pela privação de estrogénios (Ventolini and Baggish 2005).

Por outro lado, de acordo com a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), mulheres até aos 25 anos já vivenciaram pelo menos um episódio de candidose vulvovaginal e cerca de 75% que se encontra na pré-menopausa reporta pelo menos uma ocorrência desta infecção (Universitário and Unifia, 2016).

Estes resultados devem-se, sobretudo, à necessidade que *Candida albicans* tem de proliferar e germinar. Ora, na pós-menopausa, havendo decréscimo de estrogénios, há falta de glicogénio nas células epiteliais vaginais, o que torna o seu epitélio escamoso e o do colo uterino atrofado e fino e, por sua vez, dificulta a adesão às células do hospedeiro, diminuindo a probabilidade de infecção por este microrganismo (Nwokolo and Boag, 2000.).

Dependendo do quadro clínico e das características da paciente, o tratamento varia.

Em destaque encontra-se, por exemplo, o clotrimazol e miconazol (dentro dos imidazóis) e o fluconazol que pertence ao grupo dos triazóis que atuam na parede celular da levedura, propriamente na síntese de ergosterol. Outro método será alterar a permeabilidade da membrana celular e nesse caso poder-se-á recorrer a um polieno como a anfotericina B (Mercado Soares et al. 2018).

1.5.1 *Candida albicans*

Candida albicans é um fungo eucariota (Regis W., 2017) oportunista comensal que coloniza várias mucosas corporais como, por exemplo, a vaginal e a oral. Tem crescimento ótimo a pH entre 3,9 e 5. (Bastos A., et al. 2005). No crescimento em placa é possível observar colônias brancas ou com textura cremosa. Ao microscópio podem ser visualizadas células esféricas, pseudo-hifa ou hifa (Silva A. 2017)

Este fungo apresenta uma parede com glicoproteínas e antigénicos que favorecem a adesão ao hospedeiro. A parede interna possui quitina, ligações $\beta_{1,3}$ - β_1 e 6-glucanas e mananas enquanto a externa é fortemente constituída por proteínas glicosiladas (Fontinha 2010). Na membrana plasmática encontra-se ergosterol, alvo de atuação de vários antifúngicos. O passo mais importante para ocorrer infecção é a adesão às células do hospedeiro, de modo a poder sobreviver. A família de genes que codifica algumas destas proteínas é denominada de *agglutinin-like sequence* (ALS). As Als3 ligam-se às caderinas das células epiteliais do hospedeiro para serem fagocitadas para dentro da célula. Estas adesinas são também importantes para o crescimento do fungo, pois, quando em forma de hifa, ligam-se à ferritina das células epiteliais para obterem ferro (Rossi et al. 2011).

Candida albicans possui genes *SAP* (aspartil-proteases) que desempenham várias funções, tais como, degradação da barreira física e digestão de proteínas e ainda para escaparem a células de defesa do organismo, como linfócitos. Têm também fosfolipases que ajudam na lise da membrana de fosfolípidos das células (Rossi et al. 2011).

Sendo um fungo dimórfico é a sua morfologia que define a sua virulência- levedura ou filamentos- e apresenta forma de blastoconídeo, levedura unicelular, na sua fase saprofitica ou pseudo-hifa ou hifa na sua fase patogénica (Inez and Svidzinski 2007).

O sistema imunitário e a microbiota são dois fatores importantes à transição do estado comensal ao estado patogénico pois quando ocorre alguma mudança fisiológica e até mesmo mecânica que altere a relação hospedeiro-fungo pode ocorrer a infecção. Esta capacidade de *C. albicans* provocar infecção está relacionada com fatores intrínsecos de virulência como a capacidade de aderir a superfícies, alteração de fenótipo e produção de enzimas (Sp and Pacientes 2012).

Por ser capaz de produzir polissacarídeos facilmente forma biofilmes, que se caracteriza pela adesão de células planctónicas (livres) a superfícies, por ser uma espécie bastante hidrofóbica (Regis W., 2017).

1.5.1.1 Relação entre estrogénios e *Candida albicans*

Vários estudos sugerem uma relação entre a concentração elevada de estrogénios (durante terapia de reposição hormonal com altas doses de estrogénios, gravidez, ou fases específicas dos ciclos menstruais) e a incidência de candidose vulvovaginal, contudo, não se concluiu qual o fator predominante para ocorrer a infeção entre o hospedeiro, o microrganismo ou ambos (Cheng, Yeater, and Hoyer 2006).

As produções de glicogénio devido a elevados níveis destas hormonas promovem a deposição e o metabolismo do glicogénio nas células epiteliais vaginais, o que favorece o crescimento e a reprodução de *Candida albicans* uma vez que fornecem um excelente substrato ao desenvolvimento de fungos (Tavares et al. 2015).

Além disso, os estrogénios podem promover a formação do tubo germinativo de *Candida*, aumentar a sua virulência e inibir a imunidade adquirida.

1.5.1.1.1 Tubo germinativo

Um dos fatores de virulência intrínsecos a *Candida albicans* é a sua capacidade de formar tubo germinativo, que marca a transição da fase saprófita da levedura à sua fase patogénica. Em contacto com soro humano ou de animais o aparecimento de hifa é facilitado por temperaturas de cerca de 37°C durante 2 a 3 horas. Esta levedura tem a capacidade de se ligar a células do hospedeiro, como por exemplo, fibronectina, passo crucial para se dar uma infeção (Elisei 2009).

Enquanto a forma de blastoconídeo é responsável sobretudo pela disseminação da levedura, a forma filamentosa (hifa) atua sobretudo na invasão das células da mucosa vaginal facilitando a endocitose. Vários são os fatores fisiológicos que aumentam a probabilidade da transição para a fase patogénica como aumento de pH, temperatura e até a disponibilidade de nutrientes. Em células com tubo germinativo formado, a expressão de *ALS3* é incrementada, aumentando a hidrofobicidade e promovendo a adesão às células epiteliais (Elisei 2009).

Segundo Cheng et al., a concentração de estrogénios está relacionada com a formação do tubo germinativo, observando-se valores mais elevados na presença de níveis mais altos destas hormonas, contudo, mesmo os níveis fisiológicos de estrogénios podem facilitar a colonização de células descamadas do epitélio vaginal (Cheng, Yeater, and Hoyer 2006).

Ainda, em ensaios envolvendo estrogénios exógenos, foi estudado de que modo o estradiol atua na formação do tubo germinativo. De acordo com o autor, a transcrição de *TAC1* é aumentada após a entrada de 17- β -estradiol na célula, que por sua vez, é responsável pela transcrição de alguns genes como *CDR1*- o que origina o aumento de bombas de efluxo para retirar o estradiol da célula. Foram identificados, na região *upstream* dos genes *CDR1* e *CDR2*, elementos de resistência a drogas (DRE). Estradiol suprafisiológico leva à diminuição da formação de tubo germinativo pois converte-se em etinil estradiol (Cheng, Yeater, and Hoyer 2006). 17- β -estradiol após penetrar na célula aumenta a transcrição de PDR16, proteína de transferência de fosfatidilinositol não clássica, associada à resistência a medicamentos em *Candida albicans*, uma outra via de formação do tubo germinativo. Este aumento leva a maior atividade de fosfolípido D (PLD), que se pensa estar envolvido nas vias de sinalização de invasão de tecidos pelas hifas, origina ácido fosfatídico, que, por *feedback* positivo, leva a um aumento da P14P5K (fosfatidilinositol-4-fosfato 5-quinase), levando a um aumento da formação de tubo germinativo (Cheng, Yeater, and Hoyer 2006).

1.5.1.1.2 Biofilme

Define-se biofilme como sendo uma estrutura multicelular organizada contendo uma matriz de materiais exopoliméricos (Wall et al. 2019) e é um dos fatores de virulência associados à infecção por *Candida albicans*.

A formação de biofilme de *Candida* spp passa por três passos essenciais (Tsui, Kong, and Jabra-Rizk 2016):

- Fase inicial- ocorre a adesão das células à mucosa vaginal e posterior proliferação na superfície. Ocorre filamentação das células de levedura.
- Fase de maturação- Dá-se a formação das hifas.
- Fase de dispersão- as células que não aderiram libertam-se e colonizam outro local.

Vários são os fatores que levam ao aumento deste fator de virulência intrínseco de *Candida albicans* como variações de pH e/ou de nutrientes, medicação crónica do hospedeiro ou até mesmo o estado imune do hospedeiro. Estas estruturas para além de aumentarem a resistência de microrganismos aos neutrófilos, impedindo a formação de NETs (mecanismo extracelular de atuação do neutrófilo) ainda diminui a formação de ROS (espécies reagentes ao oxigénio). Para além disto, aumentam as defesas contra antifúngicos, muitos deles tornando-se apenas eficazes em elevadas concentrações, tóxicas ao hospedeiro. (Wall et al. 2019) O estudo de qual das fases- blastoconídeo ou hifa- de *Candida albicans* tem maior impacto na formação de biofilmes ainda está pouco avançado. No entanto, existe uma relação entre a formação do tubo germinativo e do biofilme, pois encontra-se descrito que uma má formação da hifa leva a um biofilme deficiente (Elisei 2009).

O biofilme possui EPS (estruturas exopoliméricas) à superfície que mantêm a estrutura agregada, pois possui carboidratos e lípidos, entre outros. No entanto, Wall G., et al referem um aumento da expressão de vários genes por células dispersas dos biofilmes como os *SAP* envolvidos na patogenicidade, genes como *ZRT1* e *ZAP1* responsáveis pela aquisição de nutrientes, genes de resistência e de adesão (Wall et al. 2019).

A formação de biofilme não só aumenta a capacidade de infetar do fungo como lhe confere proteção, diminuindo a sua vulnerabilidade aos agentes antimicrobianos (Oliveira D., Cardoso A., 2014).

Vários fatores estão implícitos ao desenvolvimento do biofilme tais como o pH, temperatura e nutrientes, essenciais à sua maturação. Fatores do hospedeiro como estrogénios são essenciais à formação de biofilmes e colonização por estes microrganismos (Feraco et al. 2016). Feraco et al. descreveram que os estrogénios estão ligados ao aumento do crescimento de algumas estirpes de *Candida albicans*, melhorando a capacidade de infeção por terem uma proteína de ligação de estrogénios e incrementando a sua virulência pois aumentam a capacidade destes microrganismos para formarem biofilmes.

1.5.1.1.3 Adesão celular

A interação dos fungos com as células epiteliais vaginais é outro foco a ter em atenção, que se inicia com a adesão de microrganismos, seguindo-se a colonização e por último, invasão. Estrogénios como o estradiol provocam o aumento de glicogénio na mucosa vaginal e paralelamente um decréscimo no pH. Este ambiente é propício ao crescimento e multiplicação de *Candida albicans*. Luan et al. observaram um aumento na fosforilação de uma cinase de adesão focal (FAK) (atua na proliferação celular e diferenciação) e de ER α , promovendo a adesão de *Candida albicans* quando estimuladas com 17- β -estradiol (Luan X., et al 2020).

Para adesão inicial às células são essenciais a EAP1 e ALS1. Já para estabilizar esta ligação são necessárias as proteínas HPW1 e ALS3 (Vogt Sionov et al. 2020).

Capítulo 2

Objetivos

Vários estudos sugerem uma relação entre as concentrações de estrogénios e a incidência de candidose vulvovaginal.

Neste trabalho pretendeu-se perceber como reage a espécie de levedura *Candida albicans*, um dos microrganismos que desencadeia a infeção associada à candidose vulvovaginal, à ação de estrona e estradiol.

Para tal, primeiramente estabeleceu-se a realização de um teste de suscetibilidade.

- Concentração mínima inibitória em células planctónicas;

Posto isto, seguiu-se o estudo de dois fatores de virulência intrínsecos a este fungo.

- Estudo da formação de biofilmes em *Candida albicans* após estímulo com estrogénios;
- Estudo da formação do tubo germinativo em *Candida albicans* após estímulo com estrogénios;

A candidose vulvovaginal é uma infeção que atinge a vulva e a vagina, portanto, outro foco de estudo foram linhas celulares presentes na região.

- Estudo para verificar a existência de recetores de estrogénios em células do colo do útero (HeLa) e do endométrio (Hec-1-A);
- Estudo do impacto dos estrogénios na infeção de células HeLa e Hec-1-A por *Candida albicans*;

Assim, estes foram os objetivos de estudo estabelecidos para melhorar a compreensão da interação de *Candida albicans* com a estrona e o estradiol.

Capítulo 3

Materiais e métodos

3.1. Preparação das hormonas

Tendo como intuito mimetizar o que ocorre no corpo da mulher na fase em que esta se encontra na menopausa, foi necessário preparar uma “solução stock” de cada hormona que abrangesse a faixa de concentrações a testar. Assim, a solução-mãe de hormonas (E1, estrona, E2, estradiol, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos da América) apresentava uma concentração de 1 mg/mL, em etanol.

Prepararam-se duas soluções de trabalho de estrona (Sigma-Aldrich), uma com 3200 pg/mL e outra com 320 pg/mL utilizando o meio de cultura YPD (Fisher BioReagents™, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos da América); e uma solução de trabalho de estradiol (Sigma-Aldrich), também em YPD (Fisher BioReagents™) com 4000 ng/mL

3.2. Efeitos das hormonas em células planctónicas (CMI)

Para a realização deste ensaio foram utilizadas uma estirpe-padrão (ATCC100231) e dez estirpes clínicas: A, 57A, 66A, 74, 84, 98, 142, 156, 172, 185 e 214 (*Candida albicans*) (Anexo I).

3.2.1. Preparação dos meios

Para dar início ao teste de suscetibilidade foi necessário preparar meios de cultura. Para a repicagem das estirpes foram utilizadas placas de Petri contendo meio sólido de Sabourad dextrose 4% agar (SDA) (VWR chemicals®, Radnor, Pensilvânia, Estados Unidos da América). Para o ensaio foi usado meio líquido *yeast-peptone-dextrose* (YPD) (Fisher BioReagents™). Foram preparados de acordo com as instruções do fabricante.

Foi também preparada uma solução de cloreto de sódio (soro, NaCl, Fisher Chemical™, Hampton, New Hampshire, EUA) a 0,85%.

3.2.2. Ensaio

No dia 1 repicaram-se as várias estirpes de *Candida albicans* (ATCC100231, 57A, 66 A, 74, 84, 98, 142, 156, 172, 185 e 214) a testar em meio SDA (VWR chemicals®) sólido e incubaram-se a 37°C durante 24 horas na estufa (Binder, Tuttlingen, Alemanha) em aerobiose.

No dia seguinte, preparou-se uma suspensão de cada estirpe, ressuspensando uma pequena porção de cultura de *Candida albicans*, com auxílio de uma ansa, em soro estéril 0,85%, e leu-se no densitómetro (Grant Instruments™ Grant Bio™, Hampton, New Hampshire, EUA) até se atingir uma densidade ótica de 0,5 McFarland.

Tendo a suspensão de cada estirpe preparada, fez-se a suspensão de trabalho, diluindo 1:20 e de seguida 1:50 em YPD (Fisher BioReagents™,).

Recorrendo a uma placa de 96 poços (VWR Chemicals®), colocaram-se 200 µL de amostra (duas concentrações para cada hormona) nos primeiros poços (linha A de 1 a 12) e 100 µL de YPD (Fisher BioReagents™) nos restantes, incluindo controlos positivo e negativo.

Fizeram-se várias diluições retirando 100 µL da amostra, ressuspensando no poço seguinte (B1) e assim sucessivamente (do B1 retiraram-se 100 µL e ressuspenderam-se no C1), descartando a ponta na última concentração (os controlos não sofreram diluições). Aferiu-se o volume dos poços até aos 200 µL com a suspensão de trabalho (adicionaram-se 100 µL a cada poço excluindo o controlo negativo).

As placas foram lidas no espectrofotómetro (xMark™, Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA) a 590 nanómetros às 0 horas e incubadas na estufa (Binder) a 37°C. Fizeram-se mais duas leituras: às 24 horas (dia 3) e às 48 horas (dia 4).

Foi feito um ensaio por placa para cada amostra: estrona (Sigma-Aldrich) a 3600 pg/mL (na primeira diluição testaram-se então os 1600 pg/mL pretendidos); estrona (Sigma-Aldrich) a 360 pg/mL (a maior diluição foram os 160 pg/mL); estradiol (Sigma-Aldrich) a 400 pg/mL (para testar a maior concentração de 200 pg/mL) e por fim estradiol (Sigma-Aldrich) a 40 pg/mL (sendo a maior diluição testada 20 pg/mL). Para cada amostra foram realizadas 6 diluições.

3.3. Efeito das hormonas na formação do tubo germinativo

De acordo com os resultados obtidos no ensaio de concentração mínima inibitória foram escolhidas duas estirpes para os ensaios que se descrevem a seguir (a 57A e a 74) pois foram as que demonstraram uma maior variação de comportamento. Repicaram e incubaram-se a 37°C durante 24h.

3.3.1. Preparação de meio e suspensões

Tal como no ensaio de suscetibilidade, também no ensaio do tubo germinativo foi necessário preparar o meio YPD (Fisher BioReagents™). Também foi preparada uma suspensão de tampão fosfato salino (PBS) (1,37 M, Fisher Scientific, New Hampshire, United States of America) a 1x e autoclavou-se.


3.3.2. Ensaio

Foram preparadas suspensões de *Candida albicans* em PBS (Fisher Scientific) 1 x com densidade de 1 Macfarland, e a cada uma delas foi adicionada hormona às seguintes concentrações:

- 1) ATCC100231 com estradiol (Sigma-Aldrich) a 10 pg/mL, 20 pg/mL, 100 pg/mL e a 200 pg/mL;
- 2) estirpe 57A com estradiol (Sigma-Aldrich) a 10 pg/mL, 20 pg/mL, 100 pg/mL e a 200 pg/mL;
- 3) estirpe 74 com estradiol (Sigma-Aldrich) a 10 pg/mL, 20 pg/mL, 100 pg/mL e a 200 pg/mL.

Também se prepararam tendo como amostra a estrona (Sigma-Aldrich) suspensões de 80 pg/mL, 160 pg/mL, 800 pg/mL e 1600 pg/mL para cada microrganismo.(Tabela 1).

Tabela 1 Condições de ensaio para o teste da formação do tubo germinativo. Cada linha representa a condição testada, nomeadamente a suspensão de estirpe e a concentração de hormona em teste.



Estirpe	Hormona								Sem hormona
	Estrona em pg/mL				Estradiol em pg/mL				Controlo positivo
ATCC100231	80	160	800	1600	10	20	100	200	
57A	80	160	800	1600	10	20	100	200	
74	80	160	800	1600	10	20	100	200	

Seguidamente foram pipetados para cada tubo de ensaio (Tabela 1) 900 microlitros (μL) de YPD (Fisher BioReagents™,) 100 μL de Soro fetal bovino não inativado (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e 250 μL das misturas preparadas anteriormente (Tabela 1)

Os tubos incubaram num agitador orbital (Agitorb 200, Aralab, Rio de Mouro, Portugal) durante 2 horas a 37°C e 180 rotações por minuto (rpm). De cada tubo foi retirada uma alíquota de 10 μL e contaram-se as células (com e sem tubo germinativo formado) na câmara de Neubauer recorrendo ao microscópio ótico com objetiva de 40x.

Os resultados são apresentados em função do resultado obtido para o controlo (% de formação de tubo germinativo).

3.4. Efeito das hormonas na formação de biofilmes

3.4.1. Ensaio

Com 24h de crescimento foi retirada uma ansa de 10 µL cheia de cada estirpe e colocada em 20mL de YPD (Fisher BioReagents™) num tubo de Erlenmeyer estéril. Foi feito um pré-inóculo ao colocar os tubos de Erlenmeyer no agitador orbital a 160 rpm e 30°C, incubando-se durante mais 24h.


Finda a incubação, descartou-se o meio, pipetou-se 1 mL para um Eppendorf e centrifugou-se (Heraeus multifuge 1S-R, Thermo Electron, Waltham, Massachusetts, EUA a 3000G durante 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o *pellet* duas vezes com PBS (Fisher Scientific) 1x. Entre lavagens centrifugaram-se os tubos a 3000G (Thermo electron) durante 5 minutos.

Procedeu-se à diluição do *pellet* em YPD (Fisher BioReagents™) e leu-se a densidade no densitómetro (Grant Instruments™ Grant Bio™) até se obterem os 0,5 Mcfarland pretendidos.

Foram preparadas quatro condições da suspensão para cada estirpe:

- Suspensão de solução a 0,5 Mcfarland + estrona (Sigma-Aldrich) (1600 pg/mL)
- Suspensão de solução a 0,5 Mcfarland + estrona (Sigma-Aldrich) (800 pg/mL)
- Suspensão de solução a 0,5 Mcfarland + estradiol (Sigma-Aldrich) (200 pg/mL)
- Suspensão de solução a 0,5 Mcfarland + estradiol (Sigma-Aldrich) (20 pg/mL)

Tabela 2 Condições de ensaio para o teste da formação de biofilme. Cada linha representa a condição estudada, nomeadamente a suspensão de estirpe e a concentração de hormona em teste.



Estirpe	Hormona				Controlos	
	Estrona em pg/mL		Estradiol em pg/mL			
ATCC100231	800	1600	20	200	CP	CN
57	800	1600	20	200	CP	CN
74	800	1600	20	200	CP	CN

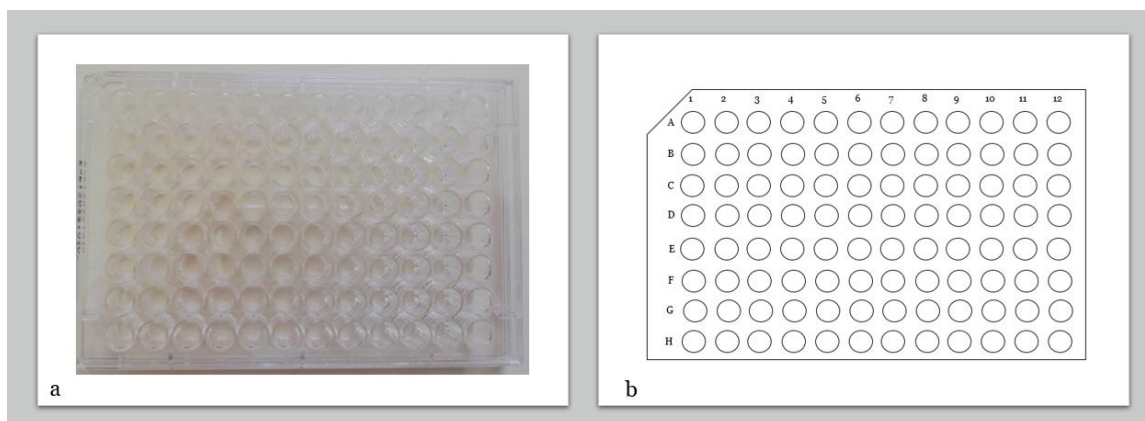


Figura 2 a) Fotografia de uma placa de 96 poços e b) esquema de uma placa de 96 poços

Considerando uma placa de 96 poços (1), de A-H na vertical e 1-12 na horizontal:

Para A1 a A6 pipetaram-se 100µL em cada poço da condição de maior concentração de estrona (Sigma-Aldrich) com a estirpe ATCC100231 e de B1 a B6 a menor concentração.

Para A7 a A12 pipetaram-se 100µL em cada poço da condição de maior concentração de estradiol (Sigma-Aldrich) com a ATCC100231 e de B7 a B12 a menor concentração.

Para C1 a C6 pipetaram-se 100µL, em cada poço, a condição de maior concentração de estrona (Sigma-Aldrich) com a estirpe 57A e de D1 a D6 a menor concentração.

De C7 a C12 pipetaram-se 100µL da condição de maior concentração de estradiol (Sigma-Aldrich) com a estirpe 57A e de D7 a D12 a menor concentração.

Por fim, para E1 a E6 pipetaram-se 100µL da condição de maior concentração de estrona (Sigma-Aldrich) com a estirpe 74 e de F1 a F6 a condição de menor concentração e

para E7 a E12 pipetaram-se 100µL da condição de maior concentração de estradiol (Sigma-Aldrich) e de F7 a F12 a menor concentração.

Os poços G1- G6 serviram de controlo positivo da estirpe ATCC100231, pipetando-se 100µL da suspensão inicial (apenas meio YPD (Fisher BioReagents™) com o microrganismo). O controlo positivo da estirpe 57A teve lugar nos poços H1-H6 e da estirpe 74 nos poços G7-G12.

O controlo negativo (apenas meio YPD) foi pipetado para os poços H7-H12.

Incubou-se a placa durante 24h na estufa a 37°C.

No dia seguinte, retirou-se todo o meio da placa, com cuidado, de modo a não danificar o biofilme formado. Lavou-se a placa duas vezes com PBS (Fisher Scientific) 1x (200 µL).

Pipetaram-se 100µL de metanol que atuou durante 15 minutos. Retirou-se, virando a placa ao contrário.

Adicionaram-se 100µL de violeta de cristal 0,02%, que atuou durante 20 minutos.

Foram adicionados 100 µL de ácido acético a 33% a cada poço.

Numa placa (2) nova pipetaram-se 180 µL de PBS (Fisher Scientific) para cada poço e adicionaram-se 20 µL do volume de cada poço da placa (1).

Leu-se a placa (2) no espectrofotômetro (Bio-Rad) a 590 nm.

Os resultados são apresentados em função do resultado obtido para o controle (% de formação de biofilme).

3.5. Ensaios celulares

Os ensaios celulares foram levados a cabo com duas linhas - as Hec-1-A (HTB-112) (ATCC®), Manassas, Virgínia) e as HeLa (CCL-2) (ATCC®, Manassas, Virgínia).

Para as células Hec-1-A (ATCC®), foi preparado meio RPMI, da Biowest® (Riverside, Estados Unidos), com antibiótico para a manutenção celular. Para os ensaios, foi também preparado meio RPMI (Biowest®) sem antibiótico (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL estreptomicina (Gibco, Alfacel, Lisboa, Portugal), para que as suspensões microbiológicas a preparar não fossem afetadas.

Para as células HeLa (ATCC®) preparou-se meio DMEM (Gibco, Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EUA) com e sem antibiótico (Thermo Fisher).

Os meios foram preparados de acordo com as indicações do fornecedor.

3.5.1 Manutenção da linha celular e cultura de células

As células encontravam-se conservadas a -80°C segundo as instruções do fornecedor. Foram cultivadas em meio de cultura (células HeLa em meio DMEM e células Hec-1-A em RPMI) até atingirem a confluência de 100%, e então foram tripsinizadas. Retirou-se todo o meio do frasco e adicionaram-se cerca de 2 mL de tripsina (Hyclone™, South Logan, Utah), de modo a tapar o fundo, e levou-se à placa de aquecimento de modo a aquecer o frasco e a facilitar a separação das células da parede do frasco. Verificou-se ao microscópio (Olympus, Torre de Vilela, Coimbra, Portugal), e, confirmando que estavam desprendidas, adicionaram-se cerca de 3 mL meio. Ressuspendeu-se e transferiu-se o conteúdo para um tubo Falcon, que foi centrifugado (centrífuga 124BR, Gyrozen, Nam-Gu, Coreia), devidamente equilibrada, a 250 fcr (força centrífuga relativa) durante 5 minutos.

Retirou-se todo o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* com meio novo. Desta suspensão, retiraram-se cerca de 3 mL para um frasco T25 e adicionaram-se cerca de 3 mL de meio, de modo a manter a linha celular.

Recolheu-se uma alíquota de 10µL para um Eppendorf ao qual se adicionaram 10µL de corante azul de tripano.

Com recurso a uma camara de Neubauer contaram-se as células coradas por quadrante com o intuito de se preparar uma suspensão que tivesse o número de células pretendido, recorrendo à seguinte fórmula:

$$X = \frac{(Y1 + Y2 + Y3 + Y4)}{4} * 2 * 10^4$$

Em que:

X= número de células por mililitro de suspensão

Y1= células coradas no primeiro quadrante

Y2= células coradas no segundo quadrante

Y3= células coradas no terceiro quadrante

Y4= células coradas no quarto quadrante

A multiplicação por 2 é referente à diluição dos 10 µL de suspensão em 10 µL de corante e por 10⁴ é devido à altura da camara de Neubauer.


Com esta equação obteve-se o número de células por mililitro de suspensão. Definiu-se que, por poço da placa de 96 poços, se colocariam 10 000 células.

Pipetaram-se 100 µL desta suspensão para os poços da placa e levou-se à incubadora durante 24h.

3.5.1.1. Adição de estímulo

Prepararam-se suspensões de estrona (Sigma-Aldrich), estradiol (Sigma-Aldrich) e etanol em meio. O ensaio levou-se a cabo com as concentrações mais elevadas das hormonas (1600 pg/mL para a estrona (Sigma-Aldrich) e 200 pg/mL para o estradiol (Sigma-Aldrich). Como referido anteriormente, no ensaio dos biofilmes, por cada 2 mL de suspensão pipetaram-se 10,05 µL de hormona. Obtiveram-se as seguintes 6 suspensões:

Tabela 3 Ensaio de infeção em linhas celulares. Constituintes de cada teste.



	HeLa	Hec-1-A
	2 mL de meio DMEM + 10,05 µL de estrona	2 mL de meio RPMI + 10,05 µL de estrona
	2 mL de meio DMEM + 10,05 µL de estradiol	2 mL de meio RPMI + 10,05 µL de estradiol
	2 mL de meio DMEM + 10,05 µL de etanol	2 mL de meio RPMI + 10,05 µL de etanol

Retirou-se o meio excedente da placa preparada no ponto 3.5.1 adicionaram-se 100 µL da suspensão com hormona nos respetivos poços. No controlo colocaram-se apenas 100 µL de meio. Incubou-se a placa por mais 24h.

3.5.1.2. Infeção

Prepararam-se 6 suspensões com as estirpes definidas- ATCC100231, 57A e 74- em meio sem antibiótico (RPMI (Biowest) e DMEM (Thermo Fisher)) até se obter uma densidade de 0,5 McFarland.

Tirou-se todo o meio da placa que foi a incubar em 4.2 e adicionaram-se 200 µL da suspensão. Levou-se a placa à centrífuga (Gyrozen) a 3000 rpm durante 5 minutos. Incubou-se durante 3 horas a 37°C em 5% CO₂ (UniEquip).

Decorrido o tempo de infeção, retirou-se todo o meio e lavou-se a placa 2 vezes com PBS (Fisher Scientific) 1X. Adicionaram-se 100 µL de água mili-q (Miliipore, Milli-Q®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) a cada poço e ressuspendeu-se

Numa placa nova adicionaram-se 180 µL de PBS (Fisher Scientific) em todos os poços. Retiraram-se 20 µL de cada poço da placa onde decorreu a infeção e adicionaram-se ao poço homólogo da segunda placa, seguindo-se de uma diluição seriada.

Por fim, retiraram-se 3 μL de cada poço da nova placa e colocaram-se numa placa de SDA (VWR chemicals®). Incubaram-se as placas (Binder) a 37°C durante 48h e fez-se a contagem das colónias. Os resultados são apresentados em função do resultado obtido para o controlo (% de infeção).

3.5.2 Extração de ARNt

Prepararam-se quatro frascos de cultura (VWR International) com células Hec-1-A (ATCC®) e quatro com células HeLa (ATCC®) que foram incubados num ambiente de 5% CO₂ a 37 °C. Após atingirem a confluência de 70% - 80% aplicou-se o estímulo em separado: estrona (Sigma-Aldrich), estradiol (Sigma-Aldrich) e etanol. Assim, obtiveram-se um frasco de células Hec-1-A (ATCC®) com estrona (Sigma-Aldrich), um frasco de células Hec-1-A (ATCC®) com estradiol (Sigma-Aldrich), um frasco com células Hec-1-A (ATCC®) com etanol e o último frasco sem qualquer estímulo, servindo de controlo. Procedeu-se de igual modo para a linha celular HeLa (ATCC®). Os frascos foram de novo incubados (180°C High Heat Decontamination CO₂ Series, UniEquip, Planegg, Alemanha), desta vez durante 24h. Após o tempo de incubação, as células foram tripsinizadas e os pellets, após centrifugação, ressuspensos em 500 μL de tri-reagente (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA) e preservados a -80°C (New Brunswick Ultra Low Temperature Freezer, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) até utilização.

As amostras foram homogeneizadas e incubadas durante 5 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, procedeu-se a uma extração orgânica pela adição de 100 μL de clorofórmio de modo a separar as 3 fases distintas (ARN, ADN e proteínas e reagentes). Agitaram-se de forma vigorosa, recorrendo ao vortex (RSLAB-6PRO, Rogo Sampaic SA, Wissous, França) e incubaram-se novamente durante 10 minutos à temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada (Gyrozen) durante 15 minutos a 12000 G, a 4°C com a finalidade de se obter uma fase aquosa que contém o ARN).

Transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo eppendorf e adicionaram-se 250 μL de isopropanol. As amostras incubaram mais 10 minutos à temperatura ambiente. Recorreu-se de novo à centrífuga (Gyrozen), desta vez apenas 10 minutos, nas mesmas condições, obtendo-se o ARN sob a forma de um precipitado branco.

O ARN sofreu dois passos de lavagem com 250 μL de etanol 75% em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). Descartou-se o sobrenadante e realizou-se um “quick spin” de modo a retirar o excesso. Após deixar secar os pellets à temperatura ambiente, rehidrataram-se com água DEPC e armazenaram-se a -80°C.

Devido ao tamanho do pellet, ressuspenderam-se as amostras provenientes das células HeLa (ATCC®) em 30 μL de água DEPC e as amostras provenientes das células Hec-1^a (ATCC®) em 20 μL .

Durante todos os passos em que não foi mencionada a temperatura ambiente, as amostras estiveram em gelo de modo a não deteriorar o ARN.

3.5.2.1 Quantificação de ARNt

De forma a determinar a quantidade e qualidade do ARN extraído efetuaram-se leituras espectrofotométricas (Implen, Munique, Alemanha) a 260 e 280 nm. Utilizou-se como branco a água DEPC. A integridade do ARN extraído foi ainda verificada através de eletroforese em gel de agarose 1% com GreenSafe Premium (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA)

3.5.2.2 Síntese de ADN complementar (ADNc)

Tabela 4 Volume de água DEPC a adicionar a cada amostra

Água DEPC a adicionar		
	HeLa em μL	Hec-1-A em μL
Controlo	7,6	7,63
Etanol	7,64	7,38
Estradiol	7,58	7,47
Estrona	7,08	7,47

Foi preparado a mistura reacional adicionando a cada amostra água DEPC, 10 μL de master mix (inclui primers oligo(dT)₁₈, dNTPs, MgCl₂ e tampão RT otimizado), 2 μL de mix de enzima (transcriptase reversa (MB12501) e inibidor de ribonucleases) e 1 μg de ARN (volume apropriado para cada amostra).

Assim que tudo foi adicionado (ARN, água DEPC, master mix e mix de enzima) as amostras foram colocadas no termociclador ((T100™ Thermal Cycler, Bio-Rad, Hercules, Califórnia, Estados Unidos da América) onde foram sujeitas a 10 minutos a 25°C, seguindo-se de uma incubação a 50°C durante 30 minutos. A reação foi inativada submetendo-se as amostras a 85°C durante 5 minutos. Adicionou-se 1 μL de RNase H, que, após a síntese da primeira cadeia de ADNc, cliva os híbridos de ARN/ADN formados durante a replicação.

O kit utilizado foi o “NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit” da NZYtech (Lisboa, Portugal)

Guardaram-se as amostras a -20°C.

3.5.2.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional para 18S

O ARN ribossômico 18S é um gene “*housekeeping*” de expressão constitutiva.

O intuito deste PCR, realizado com auxílio do termociclador (Bio-Rad) foi confirmar que a síntese de ADN complementar foi concluída com sucesso.

Como ponto de partida retiraram-se as oito amostras do congelador a -20°C e colocaram-se em gelo de modo a não degradar o material genómico. Estas eram amostras provenientes de células HeLa (ATCC®) com vários estímulos- estrona (Sigma-Aldrich), estradiol (Sigma-Aldrich), etanol e meio de crescimento- assim como amostras provenientes de células Hec-1-A (ATCC®).

Elaborou-se uma mix em que, para uma única amostra, continha:

- Master Mix 2x: 6,25 µL
- Primer Foward (50 µM): 0,1 µL
- Primer Reverse (50 µM): 0,1 µL
- Água livre de nucleases: 5,05 µL

Tanto a master mix como a água pertenciam ao kit K1081 da Termofisher SCIENTIFIC (Waltham, Massachusetts, EUA). Capaz de amplificar ADN genómico até 6 kb, a master mix possuía DreamTaq DNA polimerase (enzima), tampão DreamTaq Green otimizado, cloreto de magnésio (MgCl₂) e desoxirribonucleótidos fosfatados (dNTPs). (Man 2016)

Cada ciclo iniciou com as amostras a sofrerem temperaturas de 95°C durante 3 minutos para se dar a desnaturação inicial. Seguiu-se a desnaturação do ADN durante 30 segundos a 95°C. A temperatura de annealing foram os 56°C que atingiram as amostras durante 30 segundos, assim como a temperatura de polimerização de 72°C. O ciclo encerrou com a curva de melting (5 minutos a 72°C). Este ciclo repetiu-se 30 vezes.

3.5.2.4 Eletroforese

Os produtos amplificados por PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 2%. A cada tubo de PCR foi necessário acrescentar o loading buffer. Este encontrava-se a 6x então pipetaram-se 2,08 μL para cada tubo de amostra ((12,5 μL) /6).

Preparou-se o gel de agarose pesando-se 2 g de agarose e dissolvendo-se em 100 mL de tampão TAE com auxílio de um micro-ondas. Adicionaram-se 100 μL de greensafe (Bio-Rad).

Após o gel solidificar colocou-se na tina e pipetaram-se 10 μL de marcador de peso molecular (NZYDNA Ladder VI, NZYTech, Lisboa, Portugal) e 10 μL das restantes amostras no respetivo poço. Correu-se durante 40 minutos a 180 volts e revelou-se o gel no sistema de aquisição UVITEC (Inglaterra, Reino Unido).

3.5.3 Utilização de primers específicos

Um dos principais objetivos destes ensaios foi verificar a existência ou não de recetores de estrogénios nas células estudadas (HeLa (ATCC®) e Hec-1-A (ATCC®)). Para tal, foi necessário incluir na reação controlos positivos (controlos internos do laboratório). Estes primers foram utilizados também nas amostras estudadas a fim de se verificar se poderiam ou não amplificar possíveis recetores.

Assim, refez-se o protocolo utilizado para a realização do PCR convencional para 18S (acima descrito).

Abordando de forma subtil o sistema reprodutor masculino, nomeadamente a próstata, ER α é característico do estroma, no entanto, é fracamente expresso nas células epiteliais da próstata, sendo inexistente nas células DU145. Já o ER β é expresso de forma moderada em células PC3 e DU145. (Gibson and Saunders 2012)

Sabemos que tanto as PNT1A (células da próstata) (Ropiquet et al. 1999) como as PC3 (linha celular presente em carcinoma da próstata) (Tai et al. 2011) como as Du145 (células cancerígenas da próstata) (Shin et al. 2009) são detentoras de recetores de estrogénios. O recetor de estrogénio acoplado à proteína G ligado à membrana (GPER/GPR30) foi identificado em células PNT1A. Nas células PC3 verificou-se a existência de ER- α enquanto ER- β foram encontrados na linha celular DU145. (Filipe and Ara 2018)

Preparou-se um controlo negativo (sem amostra, apenas água). Os controlos positivos foram as linhas celulares possuidoras de recetores de estrogénios com os respetivos primers que sabíamos amplificar, ou seja, a linha Pc3 com o primer para amplificar ER- α , a linha celular Du145 com o primer para amplificar ER- β e a linha celular PNT1A com o primer capaz de amplificar o GPER.

3.6 Análise estatística

Foi utilizado o teste estatístico *one-way ANOVA* para a comparação dos valores médios obtidos da proporção de biofilme, tubos germinativos e adesão às linhas celulares formados na presença de cada hormona em relação ao controlo, sem hormona (software Graphpad Prism 7.03). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando o *p-value* correspondente a cada teste foi inferior a 0,05.

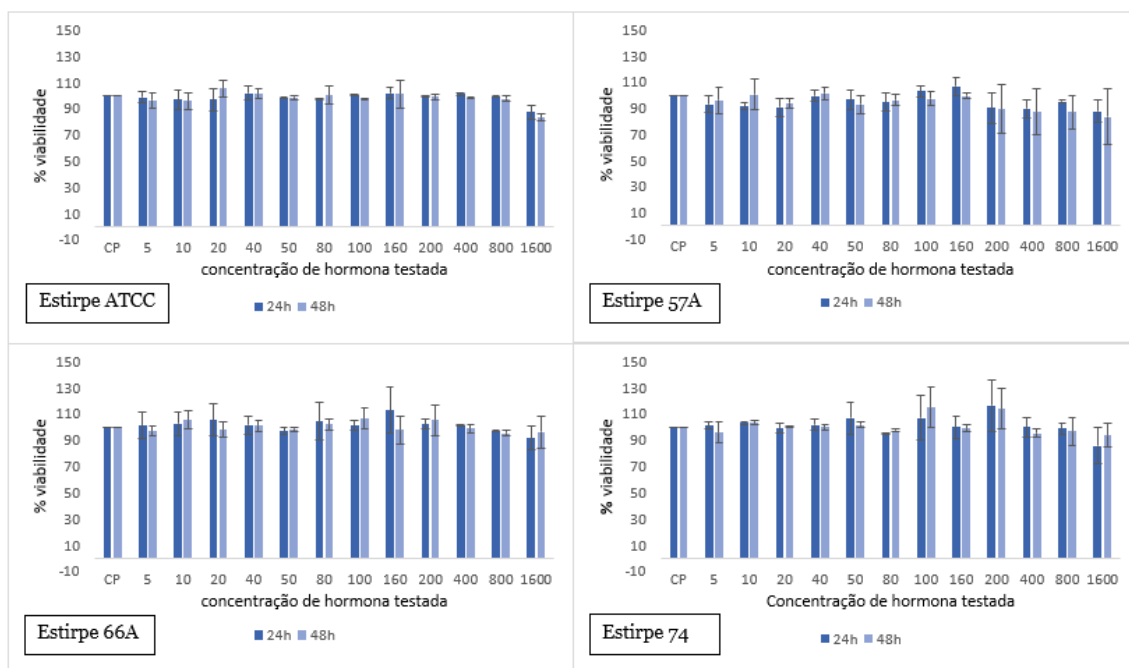
Capítulo 4

Resultados

4.1 Concentração mínima inibitória (CMI) de estrona e estradiol em células planctónicas de *Candida spp*

Os ensaios de concentração mínima inibitória são testes de suscetibilidade considerados “Gold standard” e permitem verificar qual a concentração mais baixa de antimicrobiano que é necessária para inibir o crescimento do microrganismo (Andrews J., 2001).

Seguem-se os resultados obtidos nos ensaios de determinação de CMI à estrona e ao estradiol para as estirpes de *Candida albicans* estudadas. Foi testada uma gama de concentrações acima das concentrações fisiológicas (ou seja, para a estrona testou-se uma concentração de 160 pg/mL, no entanto, também se testou a concentração de 1600 pg/mL; já para o estradiol testou-se uma concentração e 20 pg/mL, contudo, também se analisou a concentração de 200 pg/mL) de modo a verificar existência ou não de dose-dependência.



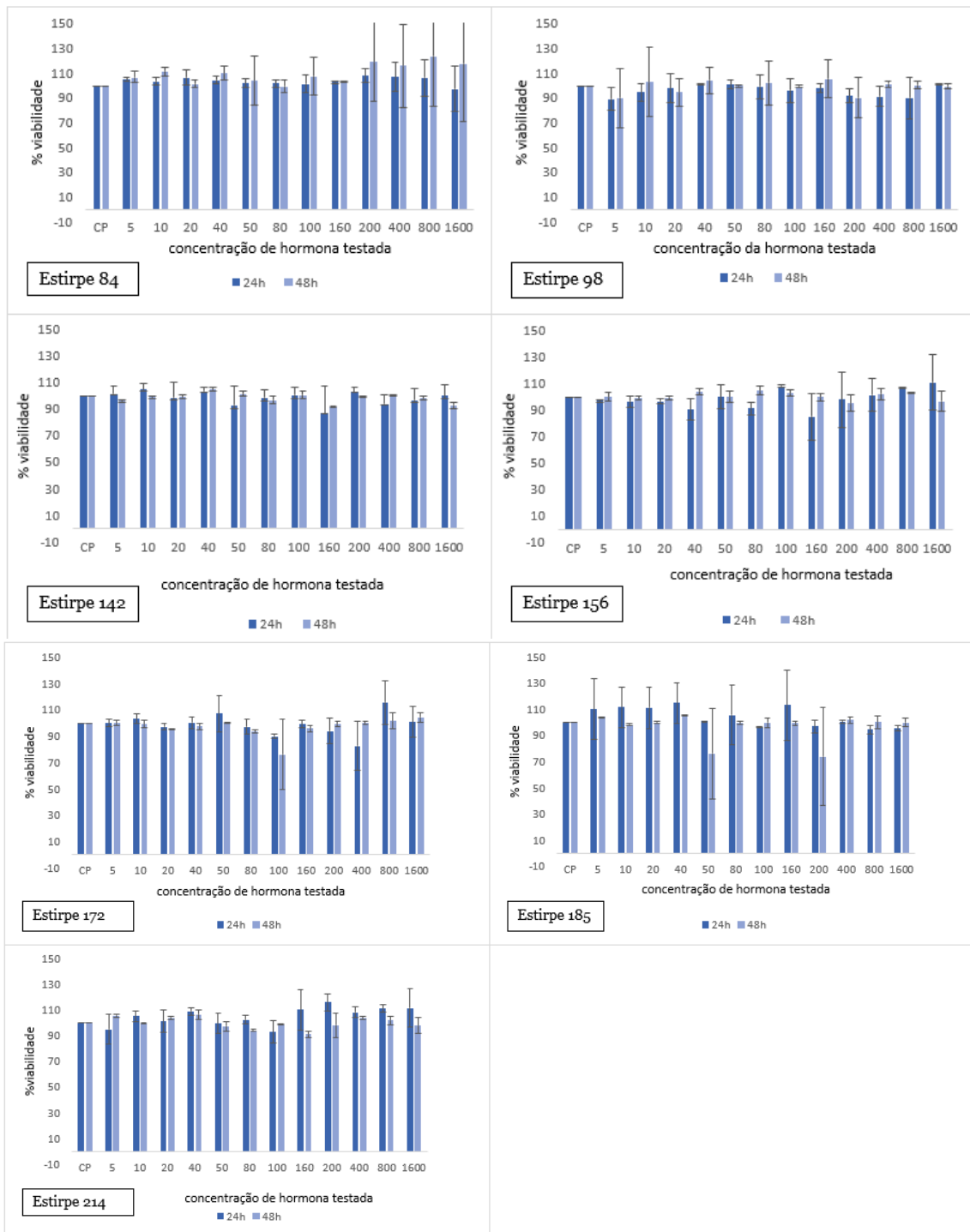


Figura 3 Ensaio de concentração mínima inibitória de estrona em estirpes de *Candida albicans*

A seguir segue uma breve análise das estirpes e de como reagiram à atuação da estrona.

Apesar de não apresentar grandes variações ao longo do tempo e das concentrações testadas, a estrona foi capaz de reduzir a viabilidade da estirpe ATCC100231 quando se fala do tempo de exposição a determinadas concentrações, nomeadamente a partir dos 100 pg/mL como é possível ver na tabela a seguir que elucida os valores do respetivo gráfico.

	CP	5	10	20	40	50	80	100	160	200	400	800	1600
■ 24h	100	98,6	96,9	97	102	98,9	98,3	100	102	99,6	101	99,8	87,4
■ 48h	100	96,7	96,1	106	102	98,5	100	98	101	99	98,7	97,7	83,4

Figura 4 Valores relativos à viabilidade da estirpe ATCC100231 testada com estrona

O comportamento da estirpe 57A é bastante semelhante ao da previamente analisada. É visível que a partir da concentração de 100 pg/mL há uma tendência para uma diminuição da viabilidade quando comparando as 24h às 48h da mesma concentração. Uma vez mais os valores mais baixos de viabilidade são atingidos nas maiores concentrações.

	CP	5	10	20	40	50	80	100	160	200	400	800	1600
■ 24h	100	93,33	91,76	90,9	99,46	96,77	94,9	103	106,8	90,31	89,68	95,45	87,63
■ 48h	100	96,33	100,7	94,23	101,5	93,23	96,53	97,52	99,71	89,58	87,29	87,11	83,74

Figura 5 Valores relativos à viabilidade da estirpe 57A testada com estrona

Tanto na estirpe 66A como na 74 a viabilidade das estirpes tendeu a diminuir quando sujeitas a maiores concentrações de hormona e, uma vez mais, o principal marco foi a concentração dos 100 pg/mL.

a		CP	5	10	20	40	50	80	100	160	200	400	800	1600
■ 24h	100	101	103	105	102	97,3	105	101	113	102	102	97,2	91,9	
■ 48h	100	97,3	106	98,4	101	98,4	102	107	98,2	105	99,1	95,4	96,4	

b		CP	5	10	20	40	50	80	100	160	200	400	800	1600
■ 24h	100	101,3	103,2	99,22	102,1	106,9	95,57	107,4	100,4	116,5	100,2	99,12	85,95	
■ 48h	100	96,13	103,4	100,8	100,4	101,7	97,82	115,2	99,33	114,1	95,69	96,93	94,02	

Figura 6 Valores relativos à viabilidade das estirpes a) 66A e b) 74 testadas com estrona

Nem todas as estirpes tiveram o comportamento até agora maioritariamente observado. Para as estirpes 84 e 98, em geral, houve uma tendência das estirpes recuperarem às 48h observando-se valores de viabilidade maiores quando comparando às 24h. Efeito similar se pode observar nas tabelas referentes aos valores de viabilidade das estirpes 142 e 156.

a	CP	5	10	20	40	50	80	100	160	200	400	800	1600
■ 24h	100	104,9	103,5	106,6	104,3	102,1	101,9	101,3	103	107,9	106,8	106,3	97,43
■ 48h	100	106,6	111,3	101,5	110,2	103,9	99,32	107,7	103,3	119	116,1	123,8	117,8

b	CP	5	10	20	40	50	80	100	160	200	400	800	1600
■ 24h	100	89,06	94,72	97,93	100,8	101	99,02	95,98	97,93	91,8	91,35	90,12	101,3
■ 48h	100	89,89	103,1	94,53	104,4	99,81	102,2	99,5	105,6	90,35	101,3	100,5	99,49

c	CP	5	10	20	40	50	80	100	160	200	400	800	1600
■ 24h	100	101	105	98,8	103	92,8	98,7	100	86,8	103	94	97	100
■ 48h	100	96,1	99	99,1	105	102	96,9	100	92,2	99,2	100	98,3	92,9

d	CP	5	10	20	40	50	80	100	160	200	400	800	1600
■ 24h	100	97	96,4	96,5	90,5	100	91,2	108	85	97,8	101	107	111
■ 48h	100	99,9	99,1	99,2	104	99,9	105	103	99,9	95	102	103	96,7

Figura 7 Valores relativos à viabilidade das estirpes a) 84 b) 98 c) 142 d) 156 testadas com estrona

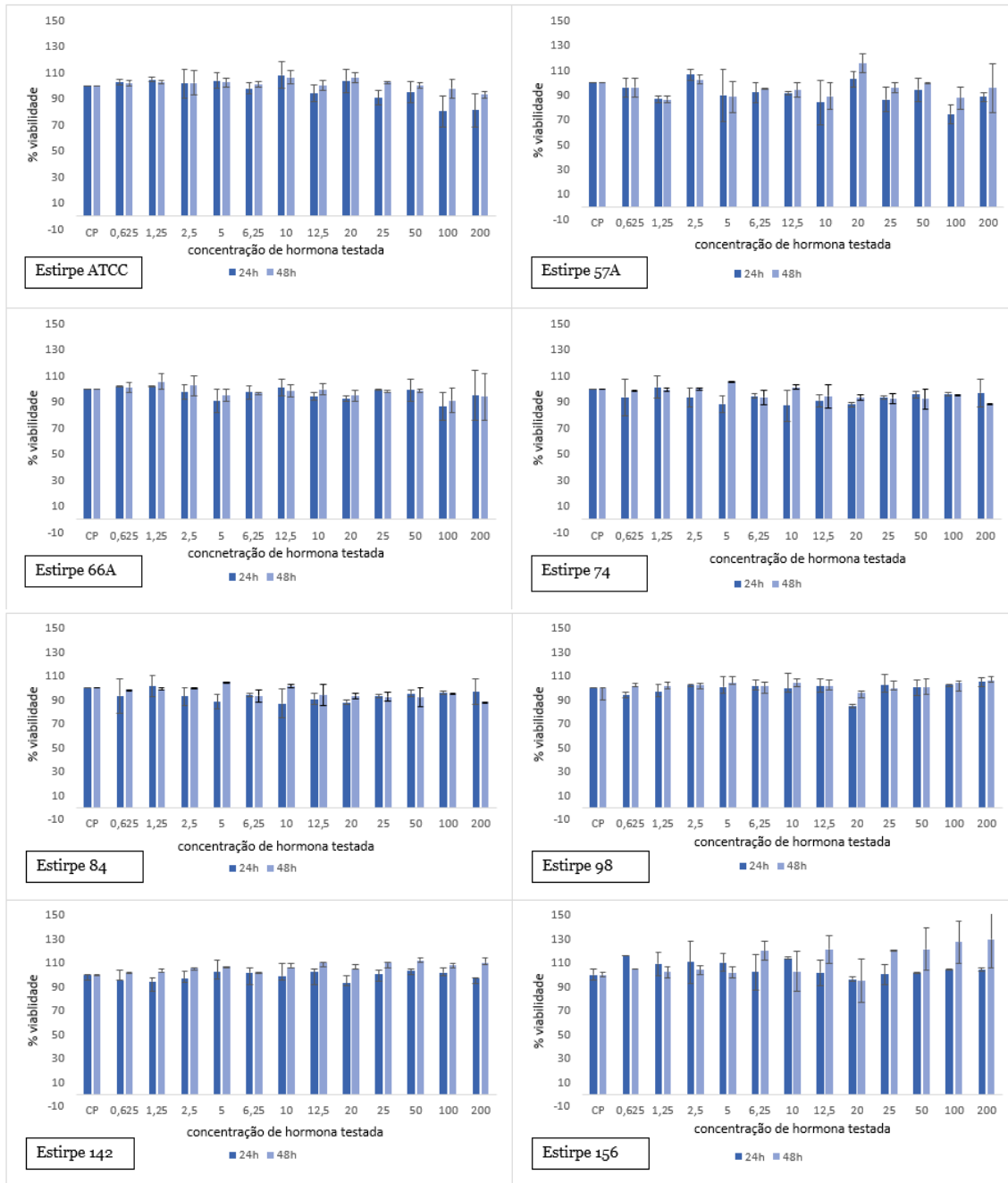
Para as estirpes 172, 185 e 214 é possível ver que o valor de viabilidade mais baixo aparece nas concentrações mais altas, nomeadamente acima dos 100 pg/mL (estirpe 172 e 185) ou nos 100 pg/mL (estirpe 214).

a		CP	5	10	20	40	50	80	100	160	200	400	800	1600
■ 24h	100	100	103	97,1	100	107	97,2	90	99,3	94,1	82,7	116	101	
■ 48h	100	100	99,1	95,9	97,5	101	93,4	76,2	95,8	99,1	100	102	104	

b		CP	5	10	20	40	50	80	100	160	200	400	800	1600
■ 24h	100	110	112	111	115	101	106	96,8	113	97,2	101	94,7	95,4	
■ 48h	100	104	98,5	100	106	76,3	99,6	99,8	99,4	73,9	102	100	99,9	

c		CP	5	10	20	40	50	80	100	160	200	400	800	1600
■ 24h	100	95,2	105,3	101,4	109,1	99,5	102,7	93,02	110,2	116	108,4	111,3	111,6	
■ 48h	100	105,7	99,95	104	106,7	97,51	94,4	98,65	91,28	98,33	103,7	102,1	97,86	

Figura 8 Valores relativos à viabilidade das estirpes a) 172 b) 185 e c) 214 testadas com estrona



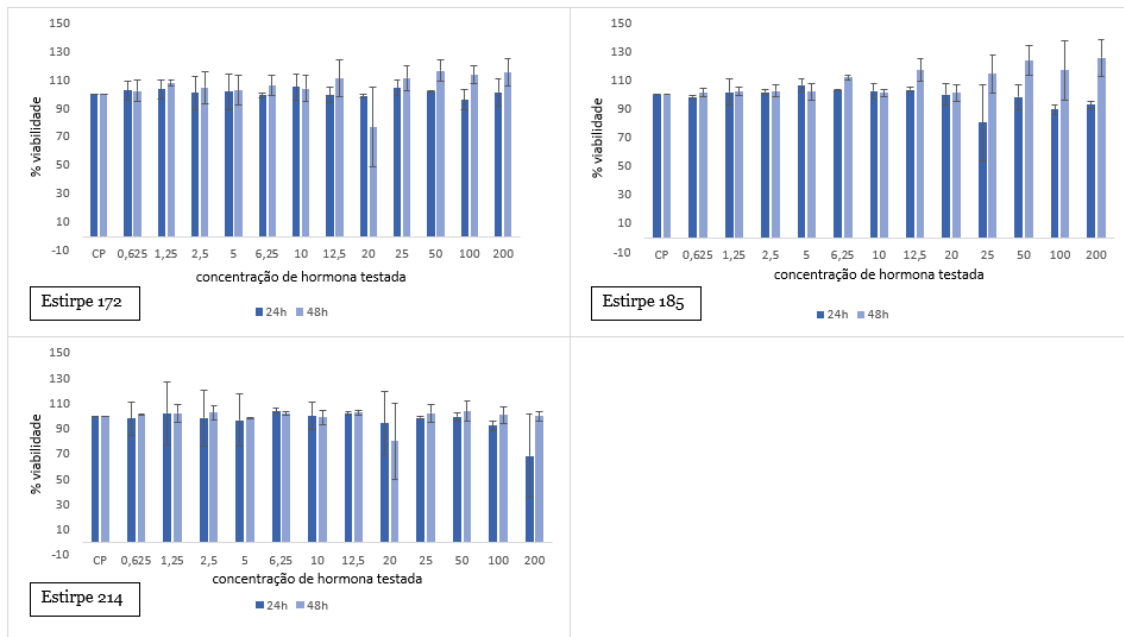


Figura 9 Ensaio de concentração mínima inibitória de estradiol em estirpes de *Candida albicans*

O estradiol é considerado o principal estrogénio circulante no organismo feminino. Para tal, sujeitaram-se as estirpes a testes de suscetibilidade a esta hormona e segue a análise feita aos resultados.

Na estirpe de controlo, ATCC100231, às 24h foi possível verificar que a percentagem de viabilidade, em geral, diminuiu nas maiores concentrações de hormona. Esta redução fez-se notar às 48h, principalmente, a partir dos 20 pg/mL. Quando comparados os valores das 24h com os respetivos valores de concentrações às 48h, observou-se um aumento de resistência por parte da estirpe às 48h.

	CP	0,625	1,25	2,5	5	6,25	10	12,5	20	25	50	100	200
■ 24h	100	102,7	104,3	101,4	103,8	97,76	108,1	94,01	103,5	90,58	94,96	80,11	81
■ 48h	100	101,8	102,8	101,8	102,3	100,7	106,4	99,98	106	102,2	100,3	97,81	92,83

Figura 10 Valores relativos à viabilidade da estirpe ATCC100231 testada com estradiol

A estirpe 57A demonstrou um notório aumento da resistência ao estrogénio às 48h, principalmente nas maiores concentrações.

	CP	0,625	1,25	2,5	5	6,25	12,5	10	20	25	50	100	200
■ 24h	100	96	86,42	106,1	89,63	91,89	91,39	83,89	102,7	86,33	94,16	74,63	88,28
■ 48h	100	96,09	86,35	102,2	88,37	95,21	93,92	88,86	115,4	95,71	99,22	87,35	95,38

Figura 11 Valores relativos à viabilidade da estirpe 57A testada com estradiol

Já as estirpes 66A e 74 não responderam de forma tão visível ao estradiol, no entanto, pareceu haver alguma resistência nas concentrações mais baixas.

a	CP	0,625	1,25	2,5	5	6,25	12,5	10	20	25	50	100	200
■ 24h	100	101,6	101,8	97,54	90,72	97,16	100,9	94,5	92,21	99,02	98,97	86,41	94,93
■ 48h	100	101	105,5	102,5	94,87	96,3	98,63	99,5	94,68	97,76	98,23	91	93,8

b	CP	0,625	1,25	2,5	5	6,25	10	12,5	20	25	50	100	200
■ 24h	100	93,26	101,3	93,12	88,32	94,22	87,11	90,7	87,86	93,06	95,39	95,91	96,73
■ 48h	100	98,35	99,26	99,68	105	93,4	101,2	94,11	93,34	92,64	92,13	95,42	88,25

Figura 12 Valores relativos à viabilidade da estirpe a) 66A e b) 74 testadas com estradiol

Como visto já anteriormente para algumas das estirpes, também as estirpes 84, 98, 142, 172, 185 e 214 demonstraram um aumento de resistência à hormona às 48h para quase todas as concentrações. Já a estirpe 156 apresentou este efeito para as maiores concentrações.

a	CP	0,625	1,25	2,5	5	6,25	10	12,5	20	25	50	100	200
■ 24h	100	93,26	101,3	93,12	88,32	94,22	87,11	90,7	87,86	93,06	95,39	95,91	96,73
■ 48h	100	98,35	99,26	99,68	105	93,4	101,2	94,11	93,34	92,64	92,13	95,42	88,25

b	CP	0,625	1,25	2,5	5	6,25	10	12,5	20	25	50	100	200
■ 24h	100	94,4	96,52	102,4	100,9	101,9	99,5	101,3	84,96	102,4	101,1	102,2	104,9
■ 48h	100	101,3	101,6	102,4	104,2	101,3	104,7	101,6	96,22	99,49	100,6	104,6	106,1

c	CP	0,625	1,25	2,5	5	6,25	10	12,5	20	25	50	100	200
■ 24h	100	95,2	94,19	96,77	102,1	101,6	99,06	102,3	92,98	100,6	102,9	101,6	96,43
■ 48h	100	101,2	102,9	105,2	106,7	101,2	106,3	110,1	104,8	109,5	111,8	108,5	110

d	CP	0,625	1,25	2,5	5	6,25	10	12,5	20	25	50	100	200
■ 24h	100	115,7	109,1	110,7	110,2	102	113,8	101,6	96,35	100,3	101,7	104,6	104,1
■ 48h	100	104,4	102	104,2	101,8	120	102,7	121,3	94,67	120,9	121,5	127,3	129,7

e	CP	0,625	1,25	2,5	5	6,25	10	12,5	20	25	50	100	200
■ 24h	100	102,2	103	100,5	101,4	98,84	104,7	99,13	98,32	104,2	101,7	95,79	101,1
■ 48h	100	102,1	107,7	104,6	102,5	105,7	103,7	110,9	76,7	111	116,2	113,3	114,8

f	CP	0,625	1,25	2,5	5	6,25	10	12,5	20	25	50	100	200
■ 24h	100	98,26	101,5	101,8	106,4	102,8	102,3	103,4	99,96	80,21	98,11	89,4	92,79
■ 48h	100	101,1	102,2	102,6	101,8	111,9	101,3	117,1	101	114,3	123,4	117,1	125,5

g	CP	0,625	1,25	2,5	5	6,25	10	12,5	20	25	50	100	200
■ 24h	100	97,88	101,9	98,23	96,56	103,6	99,75	101,7	94,31	98,4	99,3	92,12	68,3
■ 48h	100	101	102,2	102,6	98,61	101,6	99,04	102,4	79,97	102,1	103,7	100,8	99,78

Figura 13 Valores relativos à viabilidade das estirpes a) 84 b) 98 c) 142 d) 156 e) 172 f) 185 g) 214 testadas com estradiol

Em todos os ensaios realizados, quando se efetuou a leitura visual dos ensaios, não se observou concentração mínima inibitória e, portanto, não foi possível determinar qual a necessária para inibir o crescimento da levedura. Assim, para as condições estudadas, não se verificaram alterações relevantes provocadas pelas concentrações hormonais.

Em suma, a estrona comprometeu o crescimento para as concentrações mais elevadas, nomeadamente a partir dos 100 pg/mL. Algumas das estirpes sofreram impacto às 24h mas conseguiram recuperar às 48h.

O que se pôde concluir acerca do estradiol é que poderá ter algum efeito dependendo da estirpe e do tempo de exposição à hormona. A maioria mostrou recuperar às 48h após ser testada com este estrogénio.

Assim, avançamos para ensaios aos fatores de virulência intrínsecos à espécie *Candida albicans* de modo a verificar se ocorre alguma alteração que possa justificar o desenvolvimento ou não da infeção.

4.2 Formação de biofilmes de estirpes de *Candida albicans* quando testadas com estrogénios

Estima-se que cerca de 80% das infeções em humanos decorrem da formação de biofilmes (Harriott et al., 2010), este que é um dos fatores de virulência intrínsecos a *Candida albicans*. Também variações de temperatura, pH e nutrientes existentes no meio têm a sua quota parte de responsabilidade no que diz respeito à colonização da mucosa vaginal por este microrganismo, pois têm impacto num passo crucial: a ligação de glicoproteínas da parede celular e adesinas existentes na superfície a ligandos específicos existentes no hospedeiro nomeadamente, na matriz extracelular (Souza M., 2017).

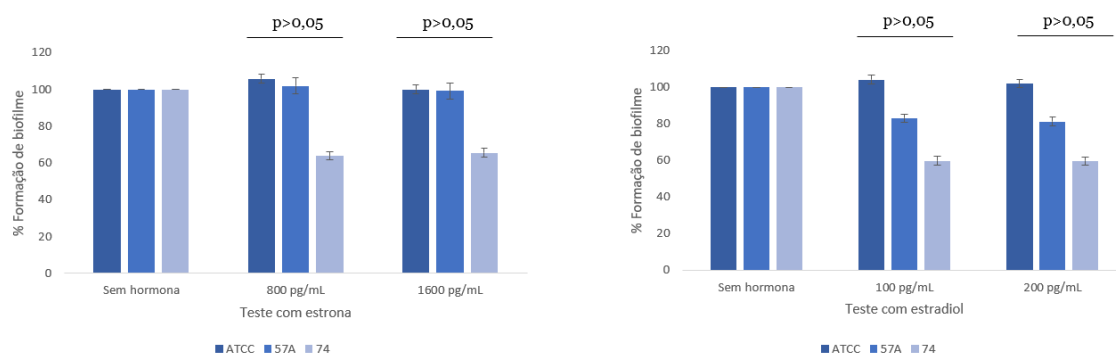


Figura 14 Ensaio de formação de biofilmes em várias condições hormonais: a) testadas com estrona; b) testadas com estradiol

Quando analisados os valores obtidos, verificou-se diminuição da formação de biofilme, quando comparadas as duas concentrações de estrona, para as estirpes ATCC100231 e 57A (aproximadamente 5,7% e 2,8% respetivamente), isto após a formação deste fator de virulência ter sido incrementado quando se comparou o teste sem hormona e a menor concentração de estrona (aproximadamente 5,6% e 1,9% respetivamente).

Já o comportamento da estirpe 74 foi oposto, visto ter sofrido um decréscimo de cerca de 36,3% quando se transitou do ensaio sem hormona para a menor concentração de estrona. No entanto, recuperou, sofrendo um aumento de aproximadamente 1,7% no teste com maior concentração de estrona, quando comparado com a menor concentração do estudo.

Abordando o ensaio do estradiol, apenas na estirpe ATCC100231 houve um aumento (cerca de 4,2%) quando se passou do ensaio sem hormona para a menor concentração de estradiol. As estirpes 57A e 74 sofreram decréscimos (aproximadamente 16,9% e 40,1% respetivamente).

Comparando a transição da menor concentração de estradiol para a maior, observou-se um decréscimo em todas as estirpes da formação de biofilme- cerca de 2,1% para a ATCC100231, 1,8% para a 57A e 0,16% para a 74.

a				b			
	Sem hormona	800 pg/mL	1600 pg/mL		Sem hormona	100 pg/mL	200 pg/mL
■ ATCC	100	105,6269907	99,9528135	■ ATCC	100	104,1524124	102,052613
■ 57A	100	101,8701408	99,09644883	■ 57A	100	83,12670729	81,35112419
■ 74	100	63,72788046	65,46598506	■ 74	100	59,86629965	59,70900511

Figura 15 Valores relativos à formação de biofilme por estirpes testadas com a) estrona b) estradiol

Se compararmos o efeito da menor concentração de estrona com a menor concentração de estradiol temos que há uma diferença de cerca de 1,47% favorável à estrona referente à estirpe ATCC100231; também para a estirpe 57A a estrona é capaz de apresentar maior formação de biofilme comparando ao estradiol (aproximadamente 18,74%), assim como para a estirpe 74 (cerca de 3,86%).

Quando se compara o efeito da maior concentração de estrona com a maior concentração de estradiol, a estirpe ATCC100231 apresentou um valor a rondar os 2,1% a favorecer a formação deste fator de virulência com estradiol. Já para as estirpes 57A e 74 a estrona teve maior impacto, com diferenças de cerca de 17,75% e 5,76%, respetivamente.

Uma vez mais a estrona teve maior impacto na expressão deste factor de virulência. No entanto, para as condições estudadas, os resultados obtidos não foram significativos nem para os testes com estrona nem para os estímulos com estradiol ($p > 0,05$).

A formação de biofilmes está intrinsecamente ligada à capacidade de a levedura formar hifas. Assim, o estudo desse fator de virulência é também importante, analisando como as várias concentrações hormonais o afetam, que será o tema do capítulo seguinte.

4.3 Mudanças na capacidade de estirpes de *Candida albicans* na formação do tubo germinativo na presença de estrona e estradiol

A capacidade de alterar a morfologia é um dos fatores que aumenta a virulência da levedura *Candida albicans*. A transição de blastoconídeo para hifa facilita a entrada nas células epiteliais humanas e consequente infecção (Inez and Svidzinski 2007).

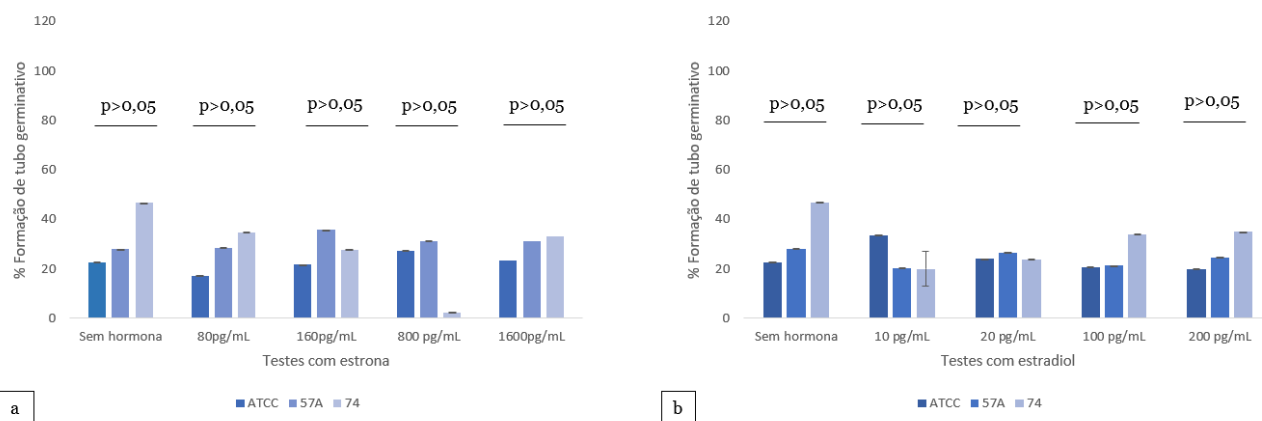


Figura 16 Ensaio de formação do tubo germinativo aplicado às estirpes ATCC100231, 57A e 74 testadas com: a) estrona; b) estradiol

No ensaio da formação do tubo germinativo pretendeu avaliar-se se esta transição morfológica está ou não relacionada como o aumento de virulência.

Quando se observam os gráficos com os resultados da estirpe ATCC100231 e 57A parece haver uma tendência ao aumento da formação do tubo germinativo quando testadas com estrona a concentrações mais altas. A estirpe ATCC100231, quando comparada com o ensaio sem hormona, apresentou o valor mais alto de formação deste fator de virulência na concentração de 800 pg/L (um aumento de cerca de 4,69%) enquanto, nos mesmos parâmetros, a estirpe 57A demonstrou uma diferença de cerca de 7,72% comparando com o seu máximo atingido na concentração de 160 pg/mL (aproximadamente 7,72%). Já para a estirpe 74, a que apresentou o valor mais elevado quando testada sem hormona, viu-se um decréscimo na formação do tubo germinativo quando testada com estrona. Mesmo o maior valor de formação de tubo germinativo viu existir um decréscimo de cerca de 12,19% quando comparado ao teste sem hormona.

Já para o estradiol, a estirpe ATCC100231 parece ter uma propensão à diminuição da capacidade de formação do fator de virulência ao longo do aumento de concentração de estradiol. No entanto, verificou-se um aumento de cerca de 10,80% à concentração de 10pg/mL quando se comparou com o teste sem hormona. Na estirpe 74 parece haver um ligeiro aumento, observando-se, no entanto, um decréscimo de cerca de 11,8% quando comparada a concentração onde se verificou uma maior formação deste fator de virulência e o ensaio sem hormona.

a						b					
	Sem hormona	80pg/mL	160pg/mL	800 pg/mL	1600pg/mL		Sem hormona	10 pg/mL	20 pg/mL	100 pg/mL	200 pg/mL
■ ATCC	22,72	17,24137931	21,69230769	27,41046832	23,44244984	■ ATCC	22,72	33,5260115623	95543175	20,74554295	19,9410609
■ 57A	27,95138889	28,52348993	35,67567568	31,08974359	31,21693122	■ 57A	27,95138889	20,29780564	26,44787645	21,37809187	24,5681382
■ 74	46,72268908	34,52958293	27,74509804	2,327586207	33,14606742	■ 74	46,72268908	20,02369668	23,91857506	33,99470899	34,92268041

Figura 17 Valores relativos à formação de tubo germinativo em estirpes testadas com a) estrona b) estradiol

Assim, para nenhum dos ensaios houve significância estatística ($p > 0,05$). (Tabela 6)

Findos os ensaios relativos aos fatores de virulência, seguem-se ensaios celulares, de modo a tentar perceber como é afetada a infeção com os estrogénios.

4.4 Quantificação de ARNt

O rácio $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ permite averiguar a pureza dos ácidos nucleicos nomeadamente a separação dos ácidos nucleicos e dos péptidos residuais. (Lee, Mccord, and Buel 2014) A_{260} corresponde à absorção da luz pelos ácidos nucleicos no comprimento de onda de 260 nanómetros. Já para as proteínas é utilizado o comprimento de onda de 280 nanómetros. (Regitano L., 2002) Quando esta relação é igual ou superior a 1,8 podemos considerar a amostra pura pois o ARN não se encontra contaminado com proteínas.

Tabela 5 Quantificação de ARNt presente no nas células HeLa e Hec-1-A, grupo controlo e testadas com etanol 70%, estradiol e estrona.

	HeLa		Hec-1-A	
	Concentração de ARNt ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Rácio $\frac{A_{260}}{A_{280}}$	Concentração de ARNt ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Rácio $\frac{A_{260}}{A_{280}}$
Controlo	2,500	1,920	2,726	1,862
Etanol	2,754	1,918	1,616	1,816
Estradiol	2,360	1,950	1,872	1,737
Estrona	1,088	1,869	1,890	1,712

Assim, podemos verificar que todas as amostras testadas têm elevado grau de pureza. No entanto, as amostras de células Hec-1-A testadas com estradiol e células Hec-1-A testadas com estrona não atingiram o valor de pureza mínimo, estando, por isso, contaminadas com proteínas.

4.4 Gel de eletroforese obtido após realização de PCR convencional 18S

De modo a confirmar o sucesso na obtenção de ADN complementar através do ARN extraído, realizou-se um PCR convencional ao 18S, um gene “housekeeping” ribossômico considerado pouco estável. Este gene é bastante utilizado pois a sua expressão pouco varia dependendo do tecido em estudo e amplifica rapidamente.

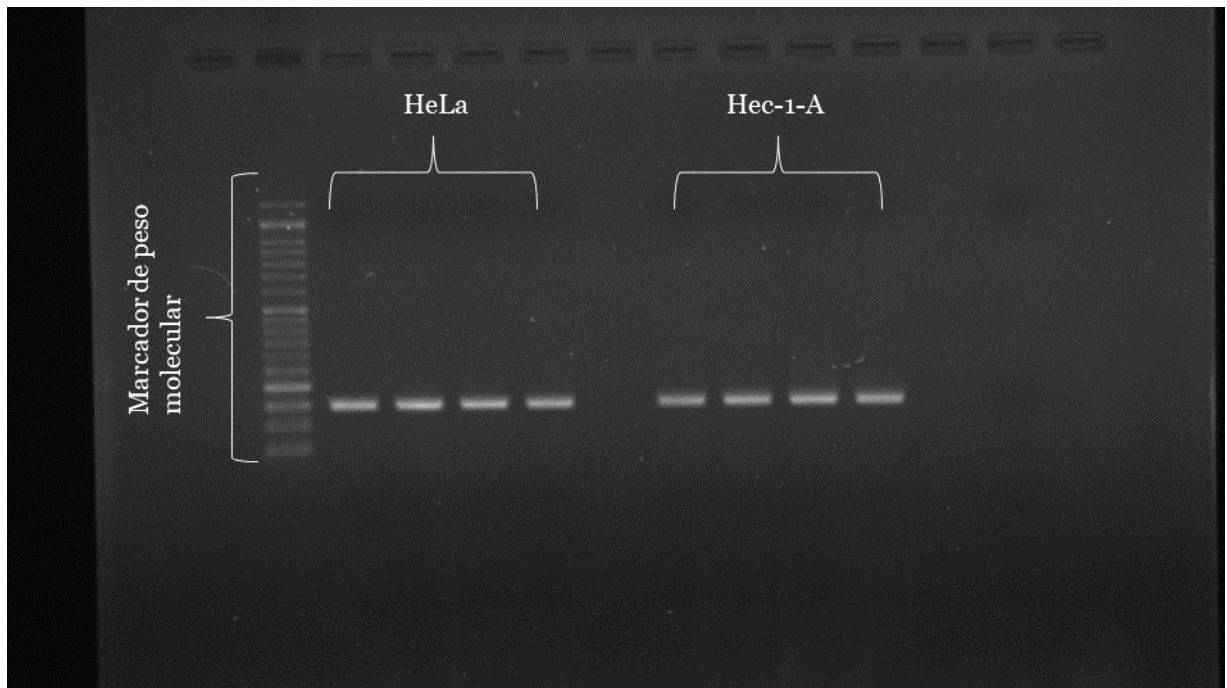


Figura 18 PCR relativo à amplificação do gene *housekeeping* 18S às linhas celulares HeLa e Hec-1-A

É possível observar que, para o peso molecular referente ao gene 18S, aparecem quatro bandas intactas tanto nas células HeLa como nas células Hec-1-A. Estes resultados demonstram a integridade do ADN complementar obtido.

4.5 Expressão dos recetores de estrogénios pelas células Hec-1-A e HeLa

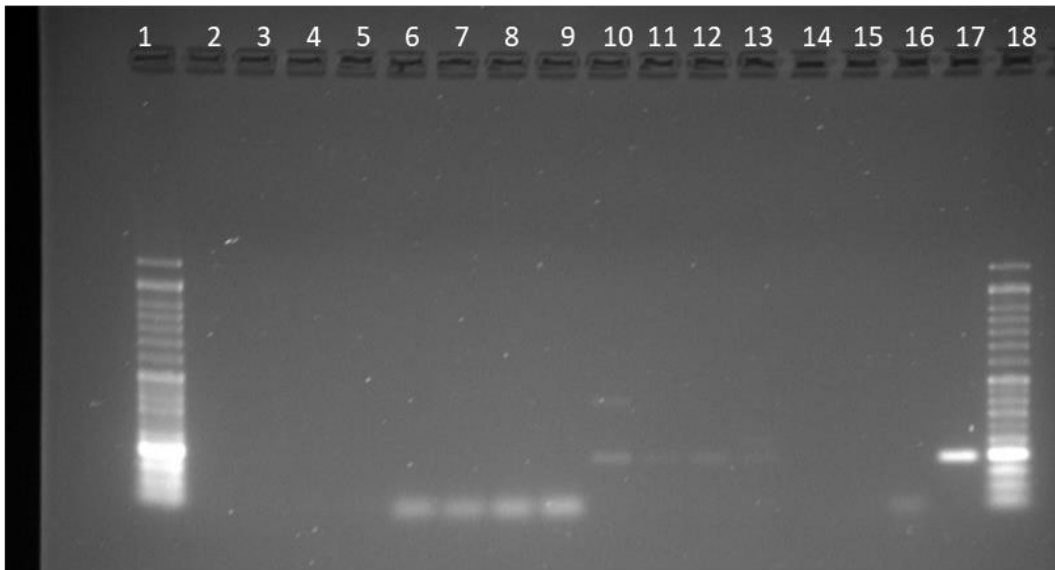


Figura 19 Gel de amplificação dos recetores da linha celular Hec-1-A com diferentes primers Marcador de peso molecular (1); Primer ER- α : estrona (2); estradiol (3); controlo etanol (4); controlo (5); Primer ER- β : estrona (6); estradiol (7); controlo etanol (8); controlo (9); P Primer GPER: estrona (10); estradiol (11); controlo etanol (12); controlo (13); controlo negativo (14); Controlo positivo primer ER- α (PC3) (15); controlo positivo primer ER- β (Du45) (16); controlo positivo primer GPER (PNT1A) (17); marcador de peso molecular (18);

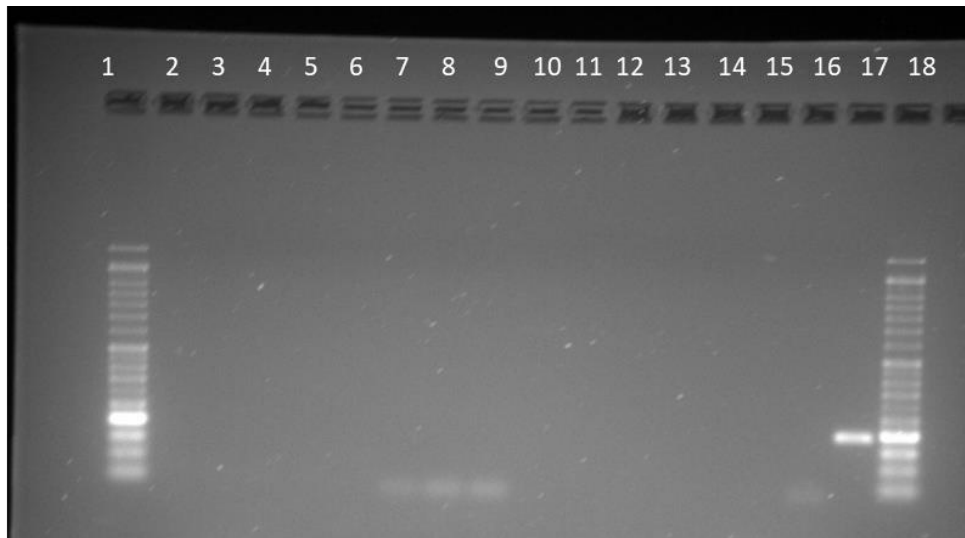


Figura 20 Gel de amplificação dos recetores da linha celular HeLa com diferentes primers Marcador de peso molecular (1); Primer ER- α : estrona (2); estradiol (3); controlo etanol (4); controlo (5); Primer ER- β : estrona (6); estradiol (7); controlo etanol (8); controlo (9); Primer GPER: estrona (10); estradiol (11); controlo etanol (12); controlo (13); controlo negativo (14); Controlo positivo primer ER- α (PC3) (15); controlo positivo primer ER- β (Du45) (16); controlo positivo primer GPER (PNT1A) (17); marcador de peso molecular (18);

Primeiramente, nos ensaios celulares, pretendeu-se verificar se as células HeLa (ATCC®) e Hec-1-A (ATCC®) expressam recetores de estrogénios.

Os resultados obtidos demonstram a expressão de GPER pelas células Hec-1-A independentemente do tratamento (Figura 8). Mais ainda demonstram que as HeLa não expressam este recetor membranar (Figura 9). Estes resultados são reforçados pela expressão do GPER pelas células da próstata PNT1A utilizadas como controlo positivo corroborados pelos elegantes estudos de Hevir-Kene *et.al.*, que atestam a existência do recetor de membrana acoplado à proteína G em células Hec-1-A e moderada de Er β , não possuindo recetores de estrogénio α . Esta linha celular apresenta pouca sensibilidade ao estradiol, sendo que consegue obter estrona a partir de sulfato de estrona (E1) e dela conversão parcial em estradiol (Hevir-kene 2014).

No que diz respeito à análise da expressão dos recetores ER α e Er β não se podem tirar elações sem novas otimizações das condições utilizadas no PCR uma vez que o próprio e respetivo controlo positivo não amplificou. Estes resultados indicam que são necessárias otimizações dos primers e das condições do ensaio.

4.6 Variações no nível de infecção em linhas celulares testadas com estrogénios

Candida albicans é um fungo comensal que consegue infectar vários tecidos do organismo humano. Células HeLa e Hec-1-A são células do colo do útero e do endométrio, respetivamente. Para estudar a forma como, numa situação de candidose vulvovaginal, este microrganismo interage com as células, fizeram-se ensaios de infecção.

O processo de infecção baseia-se em três etapas importantes (Lan Y. 2017):

- Colonização em que ocorre proliferação e adesão das leveduras
- Invasão transição de blastoconídeo a hifa e posterior penetração na célula
- Fase final em que ocorre destruição do tecido invadido.

Consoante o tipo de célula, a expressão de genes é alterada (Sommer and Cowley 2001).

Seguem-se os resultados dos ensaios que pretenderam verificar o nível de infecção causado por estirpes de *Candida albicans* nas linhas celulares testadas.

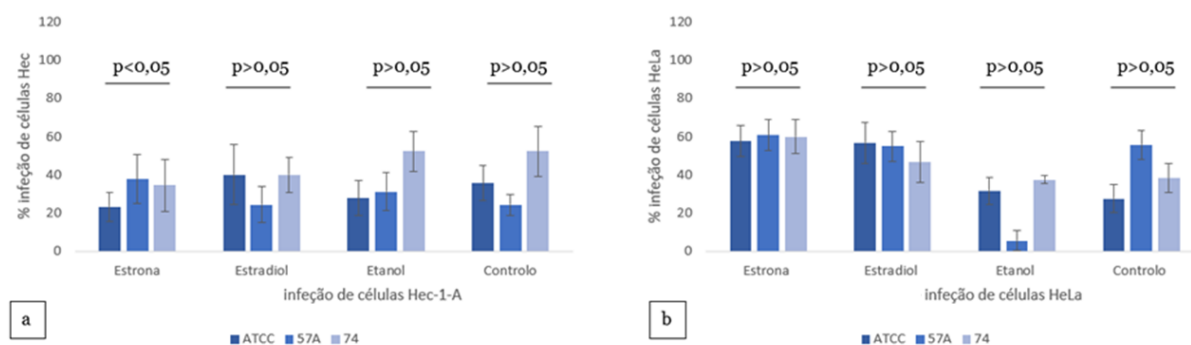


Figura 21 Ensaio de infecção realizados com linhas celulares a) Hec-1-A testada com estrona, estradiol e etanol 70% e controlo e b) HeLa testada com estrona, estradiol, etanol 70% e controlo onde se pretendeu verificar como é afetado o nível de infecção quando se sujeitam as células a diferentes estímulos

Na generalidade, parece haver uma tendência para o aumento do nível de infecção quando os ensaios se realizaram com a adição de estrogénios ao meio de crescimento.

Quando se analisou o comportamento da estirpe ATCC100231 na linha celular Hec-1-A, verificou-se uma diminuição da infecção com estrona, apresentando um valor de 23,3%, bastante inferior ao controlo. Também a estirpe 74 sofreu um decréscimo no nível de infecção 34,4%. Ao contrário da estirpe 57A, em que se observou um aumento no nível de infecção (37,78%). Estes foram os únicos valores considerados significativos.

Já na linha celular HeLa, tanto na estrona como o estradiol se verificaram valores de infeção elevados quando comparados ao controlo.

a	Estrona	Estradiol	Etanol	Controlo
■ ATCC	23,33333333	40	27,77777778	35,55555556
■ 57A	37,77776667	24,44444444	31,11111111	24,44444444
■ 74	34,44443333	40	52,22222222	52,22222222

b	Estrona	Estradiol	Etanol	Controlo
■ ATCC	57,5	56,66666667	31,66666667	27,5
■ 57A	60,83333333	55	5,666666667	55,83333333
■ 74	60	46,66666667	37,5	38,33333333

Figura 22 Valores relativos aos níveis de infeção em estirpes testadas com estrogénios em linhas celulares a) Hec-1-A e b) HeLa

Estes resultados, no entanto, não são considerados significativos ($p > 0,05$).

Comparando ao controlo, apenas a estrona na linha celular Hec-1-A teve impacto na infeção de forma significativa ($p < 0,05$). (Tabela 6)

4.7 Análise estatística

Tabela 6 Resultados da análise estatística

Teste	Estrona (p-value)	Estradiol (p-value)	Significância
Ensaio de formação de biofilme	0,6933	0,3995	Não significativo
Formação do tubo germinativo	0,7056	0,7495	Não significativo
Adesão HEC-1-A	0,0451	0,1046	Significativo (estrona)
Adesão HeLa	0,6178	0,9925	Não significativo

Após a realização dos ensaios foi necessário proceder à análise estatística de forma a verificar se os valores obtidos podem ser considerados significantes comparando com o controlo.

Com recurso ao software *one-way Anova* analisaram-se os resultados e foi possível construir a tabela acima apresentada (Tabela 6).

No que diz respeito aos ensaios de formação de biofilme verificou-se no ponto 4.2 que, em geral, houve uma diminuição do desenvolvimento deste fator de virulência quando estimulados com estrogénios. No entanto, analisando a tabela 6, verificou-se que não se obteve significância para nenhum dos estímulos (estrona e estradiol), ou seja, comparando com o controlo não se observaram diferenças significativas.

Relativamente aos ensaios de formação do tubo germinativo presente no ponto 4.3 concluiu-se que, de modo genérico, os estrogénios fizeram aumentar a formação deste fator. Apesar deste resultado, pela análise estatística verificou-se que são valores não significativos, ou seja, a diferença entre as amostras testadas com estrona e estradiol não apresentaram diferenças consideráveis do controlo (sem estímulo).

Por fim, no ponto 4.6 estão apresentados os resultados das variações no nível de infeção de linhas celulares estimuladas com estrogénios e infetadas com *Candida albicans*. Os resultados demonstraram uma tendência para um aumento do nível de infeção em ambas as linhas celulares, contudo, quando feita a análise estatística, concluiu-se que apenas a linha celular Hec-1-A testada com estrona apresentou valores de infeção com significância.

Capítulo 5

Discussão e Conclusão

Candida albicans é considerado um fungo comensal dimórfico com capacidade de provocar infecções, nomeadamente candidose vulvovaginal, caracterizada por afetar a vulva e a vagina.

Existem vários fatores de risco relacionados com a ocorrência da infecção como gravidez, diabetes ou até mesmo o uso de antibióticos. Prurido, disúria e ardor são alguns dos sintomas que podem indicar a existência desta infecção. No entanto, vários autores sugerem que possa existir uma relação entre os estrogénios e a incidência desta infecção.

Apesar de tanto a estrona como o estradiol influenciarem a atividade deste fungo, não se concluiu que estejam diretamente relacionadas com a sua viabilidade. Observaram-se nos ensaios que algumas estirpes sofreram alterações de viabilidade ao longo do tempo e/ou concentração hormonal, mas não de forma proporcional. Também Gonçalves e investigadores levaram a cabo ensaios para determinar a existência ou não de uma relação direta entre o crescimento de *C. albicans* e os estrogénios, concluindo não existir (Gonçalves et al. 2020). Isto, pois, porque depende de, pelo menos, estirpe e da concentração de hormona.

As hormonas, tanto estrona como estradiol, podem levar ao aumento do stress por parte das estirpes. Esta afirmação poderá, tal como refere Zhang X., *et al*, ser corroborada pelo aumento da expressão do gene *CDR1* (Zhang et al., 2000). Neste gene, que codifica bombas de efluxo foi observada a existência do elemento de reconhecimento AP-1, o que se pode traduzir na influência dos estrogénios na expressão de *CDR1*. Isto significa que, na presença de concentrações suprafisiológicas de estrogénio, as estirpes de *Candida albicans* atuam tal como atuam estimuladas com antifúngicos desenvolvendo mecanismos de defesa. Isto pode justificar o facto de algumas estirpes terem conseguido aumentar os valores de viabilidade quando sujeitas a valores mais altos das hormonas testadas. Esta resposta está ligada à conversão de estrogénio, caso exista em elevadas concentrações, em derivados que podem diminuir a formação de fatores de virulência (Zhang et al., 2000).

Apesar de se verificar que houve interação dos estrogénios com a expressão fenotípica dos fatores de virulência intrínsecos às estirpes estudadas, tendo-se verificado uma variação na sua expressão, esta variação não foi considerada significativa quando feita a análise estatística dos resultados.

A capacidade de alterar a morfologia é um dos fatores que aumenta a virulência da levedura *Candida albicans*. A transição de blastoconídeo para hifa facilita a entrada nas células epiteliais humanas e consequente infecção (Inez and Svidzinski 2007).

São vários os autores que referem um aumento da expressão do tubo germinativo na presença de estrogénios, como foi possível observar em algumas estirpes, nomeadamente 74 quando estimulada com estradiol e as ATCC100231 e 57A, na presença de estrona, pois o fungo possui mecanismos de ativação de vários genes, sendo o principal iniciado pela transcrição do PDR16. Este aumento da forma filamentosa de estirpes quando testadas com estrogénio foi observado por Cheng G. et al. (Cheng, Yeater, and Hoyer 2006).

No entanto, Cheng e os seu companheiros referem existir uma relação entre fatores, como condições ambientais, e o modo como as hormonas afetam a capacidade desta levedura adquirir a sua forma filamentosa, estimulando a sua formação ou redução, ou simplesmente não ter efeito, o que pode justificar a redução da formação deste fator de virulência em algumas das condições. O aumento da formação do tubo germinativo com o estradiol está dependente da estirpe em estudo e dos genes expressados (Cheng, Yeater, and Hoyer 2006).

Candida albicans possui recetores para estrogénios denominada EBP1 (proteína de ligação a estrogénios) nos vacúolos, que se liga em particular com elevada afinidade ao estradiol. O mecanismo de formação de tubo germinativo passa primeiramente pela entrada do estrogénio na célula do microrganismo, onde a elevada transcrição da TAC1 leva ao aumento do gene *CDR1*, envolvido nos mecanismos de resistência do fungo, ativando assim as bombas de efluxo para retirar o estrogénio do interior celular, em concentrações suprafisiológicas. Caso as bombas de efluxo sejam lentas a retirar todo o estradiol, a levedura pode seguir por uma via que leve à conversão de estradiol noutros compostos, levando à diminuição da formação do tubo germinativo. Ainda, produção incrementada de fosfolípido D (PLD) leva à formação de ácido fosfatídico, estimulador da P14P5K. Outra via de transição de blastoconídeo para hifa passa pela proteína de transferência fosfatidilinositol PDR16, que por sua vez, converte P14P5K que irá sintetizar PIP2 estimulando a produção de PLD (Cheng, Yeater, and Hoyer 2006).

Este mecanismo e as várias vias que a levedura pode seguir podem explicar os resultados obtidos neste trabalho visto que cada estirpe poderá expressar genes diferentes, processando o estrogénio de modos diferentes.

Estima-se que cerca de 80% das infeções em humanos decorrem da formação de biofilmes (Harriott et al., 2010), este que é um dos fatores de virulência intrínsecos a *Candida albicans*. Também variações de temperatura, pH e nutrientes existentes no meio têm a sua quota parte de responsabilidade no que diz respeito à colonização da mucosa vaginal por este microrganismo, pois têm impacto num passo crucial: a ligação de glicoproteínas da parede celular e adesinas existentes na superfície a ligandos específicos existentes no hospedeiro nomeadamente, na matriz extracelular (Souza M., 2017).

A formação de biofilme está intrinsecamente relacionada com a formação do tubo germinativo, visto que uma má formação das hifas leva a um biofilme defeituoso. No entanto, e considerando a diminuição da expressão do biofilme na presença dos estrogénios, também as células que se dispersam têm a sua importância pois são capazes de provocar novos focos de infeção.

ALS3, presentes na superfície de *Candida albicans*, são essenciais para que ocorra a adesão a uma superfície e biomassa do biofilme. ALS3 é uma proteína de superfície presente em *Candida albicans* expressa sobretudo por hifas. Jung e colaboradores verificaram que a orientação de tubo germinativo a superfícies é muito semelhante, seguindo um fluxo, o que leva a crer que é essencial para a inicialização da formação de biofilme (Jung et al. 2020).

Nos ensaios da formação de biofilmes, os resultados corroboram os de Gonçalves *et.al*, que verificaram que biofilmes formados na presença da hormona estradiol têm menor biomassa e mais baixo número de células cultiváveis independentemente da concentração testada. (Gonçalves et al. 2020) Contudo, revelaram que o estradiol poderá estar associado a um aumento da dispersão do biofilme formado e aumentar a probabilidade de contrair infeção.

Christina T., et al relatam ainda que β 1-3 glucano, presente na matriz extracelular de *Candida albicans* e que se considera estar ligado à resistência do biofilme, aumenta durante a formação do mesmo. (Tsui, Kong, and Jabra-Rizk 2016)

Sabe-se que uma má formação das hifas leva à produção de um biofilme deficiente.

São vários os genes ligados à formação do biofilme nas suas diferentes etapas. Para o desenvolvimento da filamentação que ocorre na primeira fase, os reguladores EFG1 e CPH1 têm bastante importância. Caso estejamos a falar de adesão, os genes HWP1 o PGA10 são os responsáveis assim como para a formação do biofilme. Também BCR1 é um fator transcripcional essencial no processo. A adesina ALS3, incrementada pela formação do tubo germinativo, é uma das principais responsáveis pela biomassa produzida durante a formação do biofilme (Morey A. 2016)

Em suma, são vários os genes essenciais até à obtenção de um biofilme maduro. Diferentes níveis de expressão poderão estar associados a uma maior formação quer seja do tubo germinativo, mas também do biofilme.

Ao nível de infeção de células, os estrogénios têm a sua importância. Estas hormonas são responsáveis por aumentar o glicogénio na vagina, aumentando assim o substrato e favorecendo a infeção pela levedura. Esta afirmação vai de acordo com a tendência de aumento do nível de infeção verificado neste trabalho. Desencadeiam uma cascata de resposta da cinase de adesão focal (FAK) e diminui a resposta imune à infeção. E de facto, as células com recetores de estrogénio activos foram aquelas na qual se obteve uma maior adesão das leveduras na presença dos estrogénios.

As hormonas esteroides têm a capacidade de alterar a composição das membranas celulares e, portanto, alterar a reação às infeções por microrganismos. Os estrogénios diminuem as proteínas presentes na membrana, alteram a glicosilação e aumentam a síntese de lípidos. (Sommer and Cowley 2001) Assim, os estrogénios alteram o mecanismo celular do hospedeiro de modo a favorecer a infeção por microrganismos (Federal et al. 2006).

A FAK, cinase de adesão focal existente no citoplasma, é responsável pela resposta a estímulos externos. Os estrogénios têm a capacidade de aumentar esta cinase e também os recetores dos mesmos em células do epitélio vaginal, aumentando a capacidade de adesão de *Candida albicans* às células. Estes são também responsáveis pela regulação da expressão de queratina e mucina no epitélio vaginal, levando à sua queratinização; também inibem a atuação dos neutrófilos e diminuem a expressão das citocinas de inflamação (Luan X., et al 2020).

Fidel *et.al* concluíram que os estrogénios têm um papel importante na infeção por este fungo, pois diminuem os mecanismos de defesa das células do epitélio vaginal contra *Candida albicans* (Fidel, Cutright, and Steele 2000). Também estimulam a produção de glicogénio no epitélio vaginal que tem um papel essencial na infeção pelo fungo (Luan X., et al 2020).

Os resultados de significância observados na análise estatística podem ser explicáveis porque os ensaios foram levados a cabo apenas com duas estirpes (57A e 74) e uma estirpe de controlo (ATCC100231). O número de amostras é demasiado pequeno e, aumentando este valor é possível aumentar a significância dos resultados.

Com todos os ensaios realizados foi possível verificar que o estrogénio com maior impacto é a estrona. A infeção depende da resposta da estirpe aos estrogénios, nomeadamente dos genes expressos.

Em suma, as hormonas esteroides são capazes de alterar a expressão dos fatores de virulência intrínsecos a *Candida albicans*. Estes fatores são essenciais para que ocorra uma infeção. Os estrogénios, analisando os resultados, são capazes de facilitar a infeção das células do endométrio facilitando assim o aparecimento de candidose vulvovaginal.

Assim, a concentração de estrogénio poderá estar relacionada com a incidência de candidose vulvovaginal indiretamente pois têm a capacidade de alterar a composição da membrana celular e ainda diminuir a capacidade de resposta à infeção por meio de cascatas de respostas, mas também, e ainda de forma preliminar tendo em conta os resultados obtidos neste trabalho, acredita-se que possa também o ser diretamente pois parece haver uma influência dos estrogénios na expressão fenotípica dos fatores de virulência dependendo da estirpe.

Estes dados, embora preliminares, fornecem uma avaliação abrangente dos efeitos fenotípicos da exposição aos estrogénios levando a uma visão mais integrada dos mecanismos celulares que respondem à exposição a estas hormonas. Esperançosamente, estes resultados podem fornecer uma nova visão sobre a patogénese da candidose vulvovaginal e podem abrir caminho para o tratamento clínico e o desenvolvimento de medicamentos para esta patologia.

Capítulo 6

Perspetivas futuras

Este trabalho foi desenvolvido utilizando apenas duas estirpes de estudo (57A e 74). Este valor é pequeno e seria proveitoso aumentar o número de estirpes de modo a aumentar a significância dos resultados.

Pelos resultados obtidos, sabe-se que os estrogénios têm maior impacto quando se fala em infeção das células. Aprofundar o mecanismo de infeção seria uma mais-valia. É também necessário otimizar os *primers* e as suas condições. Neste trabalho foram utilizadas linhas celulares da próstata como controlos para os recetores de estrogénios. O ideal seria utilizar outras linhas celulares, como, por exemplo, linhas celulares da mama feminina.

Os mecanismos de infeção por *Candida albicans* ainda não são completamente conhecidos e dependem da expressão de vários genes. Seria uma mais valia aprofundar o estudo acerca do modo como são expressos estes genes e as vias ativadas que agilizam a infeção.

O modo como o fungo interage no organismo, nomeadamente, os seus mecanismos de defesa poderá facilitar e desenvolver tratamentos mais eficazes.

Os estrogénios são amplamente utilizados no mundo para terapia de reposição hormonal. Este é um dos fatores que pode levar ao aparecimento de infeções tais como candidose vulvovaginal. No entanto, o estriol apresenta vários benefícios em mulheres na pré menopausa e poderá ser mais estudado de modo a tentar tirar-se proveito de ser menos fraco do que os utilizados atualmente, e com isto, levar a menos casos de infeção.

De futuro, seria vantajoso testar a influência também da progesterona em *Candida albicans*, e, tendo em conta os resultados obtidos com a estrona e estradiol, tentar perceber de que modo a expressão de fatores de virulência é afetada na presença destas hormonas. Visto a escassez de informação, investir em conhecimento acerca da estrona também seria frutífero.

Anexo I

Tabela 7 Informações relativas às estirpes estudadas

Estirpe	ATCC100231	57AA	66A	74	84	98	142	156	172	185	214
Idade	Estirpe tipo	35	29	37	29	50	43	41	39	49	62
Recorrente	Estirpe tipo	Não	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não
Menopausa	Estirpe tipo	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	Sim
Terapêutica aquando colheita	Estirpe tipo	Fluconazol	Itraconazol	Itraconazol	Não Tratada	Fluconazol	Itraconazol	Próbioticos	Cloridrato de Benzidamina	Não tratada	Clotrimazol

Bibliografia

- Aguiar, Pedro Valente. 2017. “O Ecosistema Vaginal O Ecosistema Vaginal.”, Trabalho final Mestrado Integrado em Medicina, Clínica Universitária de Obstetrícia e Ginecologia, Faculdade de Medicina de Lisboa, <https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/33193/1/PedroDVAguiar.pdf>
- Cavadas LF, Nunes A, Pinheiro M, Silva Pedro Tiago. Abordagem da menopausa nos cuidados de saúde primários [Management of menopause in primary health care]. *Acta Med Port.* 2010 Mar-Apr;23(2):227-36. Portuguese. Epub 2010 Apr 14. PMID: 20470470.
- Alderman, Myles H, and Hugh S Taylor. 2021. “Molecular Mechanisms of Estrogen Action in Female Genital Tract Development.” *Differentiation* 118 (January): 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2021.01.002>.
- Ali, Emad S. MD¹; Mangold, Cheyenne MSIII²; Peiris, Alan N. MD, PhD, FRCP(London)³ Estriol: emerging clinical benefits, *Menopause: September 2017 - Volume 24 - Issue 9 - p 1081-1085* doi: 10.1097/GME.0000000000000855
- BASTOS, A. M. C.; S. R; Bravo, R. A. G; Filho, T. B; Isolan; Barreto. 2005. “Perfil Das Mulheres Com Processo Inflamatório Por Candida Em Resultados de Colpocitologia Oncológica Numa Clínica de DST.” *Jornal Brasileiro Doenças Sexualmente Transmissíveis* ISSN: 0103-4065 15 (2): 26–38.
- Botelho, Mónica C. 2015. “_ O Papel Dos Estrogénios e Vias de Sinalização Do Recetor de Estrogénio No Cancro e Infertilidade Associados a Schistosomose,” no. 15: 19–22.
- BRASIL. 2008. *Manual de Atencao à Mulher No Climatério/Menopausa Secretaria de Atenção à Saúde. Ministério Da Saúde. 1.* http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_atencao_mulher_climaterio.pdf.
- Cheng, Georgina, Kathleen M Yeater, and Lois L Hoyer. 2006a. “Cellular and Molecular Biology of Candida Albicans Estrogen Response †.” *eukaryotic cell* 5 (1): 180–91. <https://doi.org/10.1128/EC.5.1.180-191.2006>.
- Ferracin I., De Oliveira R. Control, Disease. 2005. “Corrimento Vaginal: Causa, Diagnóstico e Tratamento Farmacológico,” 2001–2005, Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá, UEM, Campus Universitário, Maringá, Paraná, Brasil
- Dall, Elisa, Orto Figueiredo, Maria Eugênia, Rezeck Braga, Marina Bahia Monteiro, Elísia Campos, Mayara Ferreira, Martha Pantel, Santos Mota, and Alessandra Maciel Almeida. 2021. “Quality of life and climacteric symptoms in middle-aged women not on use of hormone therapy” 5 (1): 2–7.
- Damião, Bruno, Carla Miguel Oliveira, and Maria Rita Rodrigues. 2019. “Ações Genômicas e Não Genômicas Dos Hormônios Esteroides Genomic and Non-Genomic Actions of Steroid Hormones,” 46–66.

- Davis, Susan R, Robin J Bell, Penelope J Robinson, David J Handelsman, Tom Gilbert, James Phung, Reena Desai, et al. 2019. "Testosterone and Estrone Increase From the Age of 70 Years: Findings From the Sex Hormones in Older Women Study." *J Clin Endocrinol Metab* 104 (12): 6291–6300. <https://doi.org/10.1210/jc.2019-00743>.
- Holanda, Antônio Arildo Reginaldo de et al. Candidíase vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* [online]. 2007, v. 29, n. 1 [Acessado 27 Novembro 2021], pp. 3-9. Disponível em: Epub 04 Abr 2007. ISSN 1806-9339. <https://doi.org/10.1590/S0100-72032007000100002>.
- Ingrid Duijkers, Christine Klipping, Virginie Kinet, Maud Jost, Adriana Bastidas, Jean-Michel Foidart, "Effects of an oral contraceptive containing estetrol and drospirenone on ovarian function", *Contraception*, Volume 103, Issue 6,2021,Pages 386-393,ISSN 0010-7824, <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2021.03.003>.
- Elisei, Rutyanee. 2009. "Infecções Por Leveduras Do Gênero," 19–22, Universidade federal de minas gerais instituto de ciências biológicas, Departamento de microbiologia, Curso de especialização em microbiologia https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUOS-99RGU8/1/monografia_rutyanne.pdf.
- Fan, Dong-xiao, and Yi-nan Li. 2018. "17 β -Estradiol on the Expression of G-Protein Coupled Estrogen Receptor (GPER / GPR30) Mitophagy , and the PI3K / Akt Signaling Pathway in ATDC5 Chondrocytes In Vitro," e-ISSN 1643-3750, 1936–47. <https://doi.org/10.12659/MSM.909365>.
- Federal, Universidade, Rio Grande, Norte Centro, and Queiroz Filho. 2006. "Células Da Resposta Imune Em Mulheres Portadoras de Candidíase Vulvovaginal," 0–78, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte Centro de Ciências da Saúde Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas
- Feraco, Dana, Mary Blaha, Shaza Khan, Jacalyn M. Green, and Balbina J. Plotkin. 2016. "Host Environmental Signals and Effects on Biofilm Formation." *Microbial Pathogenesis* 99: 253–63. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.015>.
- Fidel, Paul L, Jessica Cutright, and Chad Steele. 2000. "Effects of Reproductive Hormones on Experimental Vaginal Candidiasis" 68 (2): 651–57. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.2.651-657.2000>
- Filipe, Joana, and Gomes Ara. 2018. "Prostate Cancer Metabolism in the Interplay of Obesity and Estrogens Actions." Dissertação de Mestrado, Universidade da Beira Interior <http://hdl.handle.net/10400.6/9811>
- Fontinha, Ana Luísa Dias. 2010. "Determinação Da Susceptibilidade de Candida Spp . à Anfotericina B , Pelo Método de Microdiluição", Monografia para obtenção do grau de licenciada, Universidade Fernando Pessoa Faculdade de Ciências Da Saúde Porto , 2010," 1–66.

- Gibson, Douglas A., and Philippa T.K. Saunders. 2012. "Estrogen Dependent Signaling in Reproductive Tissues - A Role for Estrogen Receptors and Estrogen Related Receptors." *Molecular and Cellular Endocrinology* 348 (2): 361–72. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.09.026>.
- Bruna Gonçalves, Nuno Miguel Azevedo, Mariana Henriques, Sónia Silva, Hormones modulate *Candida* vaginal isolates biofilm formation and decrease their susceptibility to azoles and hydrogen peroxide, *Medical Mycology*, Volume 58, Issue 3, April 2020, Pages 341–350, <https://doi.org/10.1093/mmy/myz070>
- Harriott, M. M., Lilly, E. A., Rodriguez, T. E., Fidel, P. L., & Noverr, M. C. (2010). *Candida albicans* forms biofilms on the vaginal mucosa. *Microbiology (Reading, England)*, 156(Pt 12), 3635–3644. <https://doi.org/10.1099/mic.0.039354-0>
- Neli Hevir-Kene, Tea Lanišnik Rižner, "The endometrial cancer cell lines Ishikawa and HEC-1A, and the control cell line HIEEC, differ in expression of estrogen biosynthetic and metabolic genes, and in androstenedione and estrone-sulfate metabolism", *Chemico-Biological Interactions*, Volume 234, 2015, Pages 309-319, ISSN 0009-2797, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.11.015>.
- Hutchesson, M.J., de Jonge Mulock Houwer, M., Brown, H.M. *et al.* Supporting women of childbearing age in the prevention and treatment of overweight and obesity: a scoping review of randomized control trials of behavioral interventions. *BMC Women's Health* 20, 14 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12905-020-0882-3>
- Álvares, Cassiana Aparecida, Svidzinski, Terezinha Inez Estivalet e Consolaro, Márcia Edilaine LopesCandidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* [online]. 2007, v. 43, n. 5, pp. 319-327. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442007000500004>. Epub 06 Dez 2007. ISSN 1678-4774. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442007000500004>.
- Jung, P.; Mischo, C.E.; Gunaratnam, G.; Spengler, C.; Becker, S.L.; Hube, B.; Jacobs, K.; Bischoff, M.Candida albicans Adhesion to Central Venous Catheters: Impact of Blood Plasma-Driven Germ Tube Formation and Pathogen-Derived Adhesins. *Virulence* 2020,11, 1453–1465 <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1836902>.
- Aliza Kalo and Esther Segal. Interaction of *Candida albicans* with genital mucosa: effect of sex hormones on adherence of yeasts *in vitro*. *Canadian Journal of Microbiology*. 34(3): 224-228. <https://doi.org/10.1139/m88-042>
- Lee, Steven B., Bruce Mccord, and Eric Buel. 2014. "Advances in Forensic DNA Quantification: A Review." *Electrophoresis* 35 (21–22): 3044–52. <https://doi.org/10.1002/elps.201400187>.
- Leite, Ericka Garcia, and Tiago Ferreira. 2012. "Principais Patógenos Oportunistas Decorrentes No Climatério," no. 83.

- Levin, Ellis R. 2011. "Minireview: Extranuclear Steroid Receptors: Roles in Modulation of Cell Functions." *Molecular Endocrinology* 25 (3): 377–84. <https://doi.org/10.1210/me.2010-0284>.
- Luan Xia Liu Pengyuan Mao Xinyan Wang Can Rui Lina Yan Yiquan Wang Chong Fan Ping Li Xin Zeng, Ting. 2020. "The role of 17 β -estrogen in candida albicans adhesion on human vaginal epithelial cells via fak phosphorylation." *Mycopathologia*, Volume 185, Issue 3, 425-438 <https://doi.org/10.1007/s11046-020-00440-1>.
- Madalena, Maria, and Brito Soares. 2004. "Menopausa: o papel dos fitoestrogénios", Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto, https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/54485/6/73223_04-52T_TL_01_P.pdf
- Marques, Raquel Patricia. 2017. "Nanopartículas de Ouro No Tratamento Do Cancro Da Mama." Monografia de Mestrado Integrado, *Universidade Do Algarve*. <Http://oncomais.pt/cancro/tipos-de-cancro/mama/tratamento#estádio-avancado-estádio-iv>.
- Oliveira D., Cardoso A. Mayssara A. Abo Hassanin Supervised, Affiifi. 2014. "Biofilmes microbianos: um desafio para a saúde" *Paper Knowledge . Toward a Media History of Documents*.
- Mendling, Werner, and W Mendling. 2016. "Vaginal Microbiota." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 902. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31248-4_6.
- Mercado Soares, Dagmar, Edeltrudes De Oliveira Lima, Maria Mercado Soares, Nataniel Francisco, D A Silva, Nataly Gabrielly, Mercado Costa, et al. 2018. "candidíase vulvovaginal: uma revisão de literatura com abordagem para candida albicans vulvovaginal candidiasis: a literature review with a approach to candida albicans." *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research-BJSCR* 25 (1): 28–34. <http://www.mastereditora.com.br/bjscr>.
- Morey A. Bioinformática, o E M. 2016. "Inferência de Rede de Regulação Da Expressão de Genes Relacionados Ao Biofilme de Candida Albicans Influenciados Pelo Ácido Lático." Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) Universidade Federal Tecnológica do Paraná, Londrina <http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/23543>
- Silva A. 2017. "Potencial da radiação ultravioleta na inibição de fungos leveduriformes e filamentosos", Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pelotas, <http://guaiaca.ufpel.edu.br:8080/handle/prefix/4628>
- Nwokolo, N.C., Boag, F.C. Chronic Vaginal Candidiasis. *Drugs & Aging* 16, 335–339 (2000). <https://doi.org/10.2165/00002512-200016050-00003>
- Lan, Y. B., Huang, Y. Z., Qu, F., Li, J. Q., Ma, L. J., Yan, J., & Zhou, J. H. (2017). Time course of global gene expression alterations in *Candida albicans* during infection of HeLa cells. *Bosnian journal of basic medical sciences*, 17(2), 120–131. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2017.1667>
- Pedras, Célia. 2017. "Transição Para a Menopausa: Necessidades e Expectativas," 81, Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Enfermagem de Lisboa

- Prasad, Rajendra, Atanu Banerjee, Nitesh Kumar Khandelwa, and Sanjiveeni Dhamgaye. 2015. "The ABCs of Candida Albicans Multidrug Transporter Cdr1." *Eukaryotic Cell* 14 (12): 1154–64. <https://doi.org/10.1128/EC.00137-15>.
- Qureshi, Rehana, Manuel Picon-Ruiz, Iskander Aurrekoetxea-Rodriguez, Vanessa Nunes de Paiva, Massimo D'Amico, Hyunho Yoon, Ramya Radhakrishnan, et al. 2020. "The Major Pre- and Postmenopausal Estrogens Play Opposing Roles in Obesity-Driven Mammary Inflammation and Breast Cancer Development." *Cell Metabolism* 31 (6): 1154-1172.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.05.008>.
- Rees, M. 1995. "The Age of Menarche." *ORGYN : Organon's Magazine on Women & Health*, (4):2-4. PMID: 12319855.
- Richard, West, Garry Graham, Michael Wright, Christopher White, Gordana Popovic, and Kate Hilda. 2021. "Serum Concentrations of Estriol Vary Widely after Application of Vaginal Oestriol Cream," no. September 2020: 2354–60. <https://doi.org/10.1111/bcp.14635>.
- Richardson, Harriet, Vikki Ho, Romain Pasquet, Ravinder J Singh, Matthew P Goetz, Dongsheng Tu, Paul E Goss, and James N Ingle. 2020. "Baseline Estrogen Levels in Postmenopausal Women Participating in the MAP.3 Breast Cancer Chemoprevention Trial" 27 (6): 693–700. <https://doi.org/10.1097/GME.0000000000001568>.
- Ropiquet, F., Huguenin, S., Villette, J.-M., Ronflé, V., Le Brun, G., Maitland, N.J., Cussenot, O., Fiet, J. and Berthon, P. (1999), FGF7/KGF triggers cell transformation and invasion on immortalised human prostatic epithelial PNT1A cells. *Int. J. Cancer*, 82: 237-243. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19990719\)82:2<237::AID-IJC14>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19990719)82:2<237::AID-IJC14>3.0.CO;2-Q)
- Rossi, Tatiane De, Marcell Alysson, Batisti Lozovoy, Rosiane Valeriano, Eduardo Vignoto Fernandes, Thais Herrero Geraldino, Ivete Conchon, et al. 2011. "Interações Entre Candida Albicans e Hospedeiro Interactions Between Candida Albicans and Host," Volume 32, n.1, 15–28. <https://doi.org/10.5433/1679-0367.2011v32n1p15>.
- Schwartz, Andreas. 2016. *Microbiota of the Human Body*. Adv Exp Med Biol, 902.
- Shin, Dae-Seop, Hye-Nan Kim, Ki Deok Shin, Young Ju Yoon, Seung-Jun Kim, Dong Cho Han, and Byoung-Mog Kwon. 2009. "Cryptotanshinone Inhibits Constitutive Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Function through Blocking the Dimerization in DU145 Prostate Cancer Cells." *Cancer Res* 69 (1): 193–202. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2575>.
- Pires Patrícia, 2016, "Síntese de Derivados Da Estrona Funcionalizados Nos Anéis C e D Como Potenciais Agentes Anti-Cancerígenos" Experiência Profissionalizante Na Vertente de Farmácia Comunitária e Investigação." Dissertação de Mestrado, Universidade da Beira Interior, <http://hdl.handle.net/10400.6/5460>

- Sommer, P., and H. M. Cowley. 2001. "Effect of Steroid Hormones on Membrane Profiles of HeLa S3 Cells." *Cell Biology International* 25 (1): 103–11.
<https://doi.org/10.1006/cbir.2000.0682>.
- Oliveira, F. A. M. (2012). Infecções oportunistas causadas por leveduras do gênero *Candida* sp. em pacientes imunocomprometidos. *Belo Horizonte*. Especialização em Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, <http://hdl.handle.net/1843/BUOS-99RHN7>
- Tai, Sheng, Yin Sun, Jill M Squires, Hong Zhang, William K Oh, Chao-Zhao Liang, and Jiaoti Huang. 2011. "PC3 Is a Cell Line Characteristic of Prostatic Small Cell Carcinoma." *The Prostate* 71: 1668–79. <https://doi.org/10.1002/pros.21383>.
- Tavares, Elizabeth, S Oliveira, Caroline Sanuzi, and Quirino De Medeiros. 2015. "Fatores Predisponentes Do Hospedeiro Para O Desenvolvimento De Candidíase Vulvovaginal-Um Estudo Bibliográfico," 1–10. <https://openrit.grupotiradentes.com/xmlui/handle/set/2802>.
- Tomusiak, Anna, Magdalena Strus, Piotr B. Heczko, Paweł Adamski, Grzegorz Stefański, Aleksandra Mikołajczyk-Cichońska, and Magdalena Suda-Szczurek. 2015. "Efficacy and Safety of a Vaginal Medicinal Product Containing Three Strains of Probiotic Bacteria: A Multicenter, Randomized, Double-Blind, and Placebo-Controlled Trial." *Drug Design, Development and Therapy* 9 (September): 5345–54.
<https://doi.org/10.2147/DDDT.S89214>.
- Tsai, Chia Lung, Chiao Yun Lin, Angel Chao, Yun Shien Lee, Ren Chin Wu, Chi Neu Tsai, Chih Feng Yen, and An Shine Chao. 2021. "Gpr30 Activation by 17β-Estradiol Promotes P62 Phosphorylation and Increases Estrogen Receptor α Protein Expression by Inducing Its Release from a Complex Formed with Keap1." *Journal of Personalized Medicine* 11 (9): 1–17.
<https://doi.org/10.3390/jpm11090906>.
- Tsui, Christina, Eric F Kong, and Mary Ann Jabra-Rizk. 2016. "Pathogenesis of *Candida Albicans* Biofilm" 74: 18. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw018>.
- Universitário, Centro, and Amparense Unifia. 2016. "AMPARENSE-UNIFIA II JORNADA CIENTÍFICA," no. 19.
- Ventolini, Gary, and Michael S Baggish. 2005. "Post-Menopausal Recurrent Vaginal Candidiasis : Effect of Hysterectomy on Response to Treatment , Type of Colonization and Recurrence Rates Post-Treatment" 51: 294–98. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2004.08.012>.
- Vogt Sionov, Ronit, Mark Feldman, Reem Smoum, Raphael Mechoulam, and Doron Steinberg. 123AD. "Anandamide Prevents the Adhesion of Filamentous *Candida Albicans* to Cervical Epithelial Cells." <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70650-6>.
- Wall, Gina, Daniel Montelongo-jauregui, Bruna Vidal Bonifacio, Jose L Lopez-ribo, and Priya Uppuluri. 2019. "ScienceDirect *Candida Albicans* Biofilm Growth and Dispersal : Contributions to Pathogenesis." *Current Opinion in Microbiology* 52: 1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.04.001>.

Wise, L. A., & Laughlin-Tommaso, S. K. (2016). Epidemiology of Uterine Fibroids: From Menarche to Menopause. *Clinical obstetrics and gynecology*, 59(1), 2–24. <https://doi.org/10.1097/GRF.000000000000164>

Xiaoqian Zhang, Michael Essmann, Edward T. Burt, Bryan Larsen, Estrogen Effects on *Candida albicans*: A Potential Virulence-Regulating Mechanism, *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 181, Issue 4, April 2000, Pages 1441–1446, <https://doi.org/10.1086/315406>