



Acta Scientiarum. Health Sciences

ISSN: 1679-9291

eduem@uem.br

Universidade Estadual de Maringá

Brasil

Etgeton, Simone Américo; Chassot, Francieli; Gandolfi Boer, Cinthia; Donatti, Lucélia; Estivalet Svidzinski, Terezinha Inez; Lopes Consolaro, Marcia Edilaine
Influência da co-agregação entre *Candida. albicans* e *Lactobacillus acidophilus* na capacidade de adesão destes microrganismos às células epiteliais vaginais humanas (CEVH)
Acta Scientiarum. Health Sciences, vol. 33, núm. 1, 2011, pp. 1-8
Universidade Estadual de Maringá
Maringá, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=307226628004>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe , Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Influência da co-agregação entre *Candida albicans* e *Lactobacillus acidophilus* na capacidade de adesão destes microrganismos às células epiteliais vaginais humanas (CEVH)

Simone Américo Etgeton¹, Francieli Chassot¹, Cinthia Gandolfi Boer¹, Lucélia Donatti², Terezinha Inez Estivalet Svidzinski³ e Marcia Edilaine Lopes Consolaro^{1*}

¹Laboratório de Citolgia Clínica, Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. ²Laboratório de Microscopia Eletrônica, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil. ³Laboratório de Micologia Médica, Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: melconsolaro@uem.br

RESUMO. Este trabalho teve por objetivo avaliar a influência da co-agregação *in vitro* entre *Candida albicans* e *Lactobacillus acidophilus* na capacidade de adesão destes microrganismos às células epiteliais vaginais humanas (CEVH). Foram utilizados um isolado vaginal de *C. albicans* e uma cepa ATCC de *L. acidophilus*. Uma suspensão de cada microrganismo isoladamente e do co-agregado foram incubados com as CEVH obtidas de uma doadora saudável. Foram feitos esfregaços por cristal violeta e Papanicolaou, e o número de leveduras, lactobacilos ou co-agregados aderidos às células foi contado (em 300 células superficiais-CS e 300 intermediárias-Cl). A Microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada em todas as situações dos ensaios. Leveduras e lactobacilos aderiram fortemente as CEVH, tanto em CS quanto em Cl. A co-agregação levou a um aumento na capacidade de adesão das leveduras ($p < 0,001$) e diminuiu a dos lactobacilos ($p < 0,001$). A adesão dos microrganismos isolados ou co-agregados não apresentou diferença entre CS e Cl ($p > 0,05$). Havendo correlação com o que acontece *in vivo*, probióticos à base de *L. acidophilus* e mesmo uma flora lactobacilar vaginal não surtiriam efeito protetor contra a adesão de *C. albicans* as CEVH e do possível desenvolvimento de candidíase vulvovaginal.

Palavras-chave: co-agregação, *Candida albicans*, *Lactobacillus acidophilus*, células vaginais, aderência.

ABSTRACT. Influence of the co-aggregation between *Candida albicans* e *Lactobacillus acidophilus* on the adhesion capacity these microorganisms in the human epithelial vaginal cells (HEVC). This work has aimed to evaluate the influence of the *L. acidophilus* and *Candida albicans* co-aggregation on the adhesion capacity this microorganisms in the human epithelial vaginal cells (HEVC). One vaginal isolated of *C. albicans* and one ATCC strain of *L. acidophilus* was used. A suspension of the isolated and co-aggregated microorganisms was incubated with HVEC obtained from a healthy donor. After one hour, smears were made with crystal violet and Papanicolaou, and the number of yeasts adhered to HVEC was evaluated (300 superficial-SC and 300 intermediate cells-IC). Scanning electron microscopy (SEM) was made in all situations of the assays. Yeasts and lactobacilli adhered strongly to the HEVC, both SC and IC. The co-aggregation there was an increase in the adhesion capacity of the yeasts ($p < 0.001$) and a diminished adhesion of the lactobacilli ($p < 0.001$) in SC and IC. The adhesion of isolated and co-aggregated microorganisms was not significantly different between SC and IC ($p > 0.05$). Supposing that of these findings correlated with the conditions *in vivo*, the use of probiotics based on *L. acidophilus* or its presence in the vaginal microbiota would not protect against the adhesion of *C. albicans* to the HVEC and possible consequent vulvovaginal candidiasis.

Keywords: co-aggregação, *Candida albicans*, *Lactobacillus acidophilus*, vaginal cells, adherence.

Introdução

As vaginites infecciosas são causadas principalmente por bactérias, fungos leveduriformes e *Trichomonas vaginalis* (GEVA et al., 2006). A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma doença causada pelo crescimento anormal de fungos do tipo leveduras na mucosa do trato genital feminino, classificada pela Organização

Mundial da Saúde (OMS) como uma Doença Sexualmente Transmissível (DST) de frequente transmissão sexual (REESE; BETTS, 1991).

CVV é causada predominantemente pelo gênero *Candida*, sendo o principal agente *Candida albicans*. Para alguns autores, a prevalência desta levedura pode chegar de 85 a 95% (SOBEL, 2007). Entretanto,

estudos têm indicado o aumento percentual das espécies *C. não-albicans* (*C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis* e *C. lusitaniae*), de modo que *C. albicans*, em algumas populações, têm sido responsabilizada por aproximadamente 50% dos casos (FERRAZA et al., 2005). *C. glabrata* é a segunda espécie em frequência nas CVV e leveduras de outros gêneros também podem causar esta infecção, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula* sp. e *Trichosporon* sp. (FERRAZA et al., 2005; CONSOLARO et al., 2004).

Por acometer milhões de mulheres anualmente, determinando grande desconforto, interferindo nas relações sexuais e afetivas e prejudicando o desempenho laboral, a CVV têm sido considerada um importante problema de saúde pública mundial (SOBEL, 2007). É a primeira causa de vulvovaginite na Europa e a segunda nos Estados Unidos e no Brasil, onde é precedida pela vaginose bacteriana. Representa de 20 a 25% dos corrimientos vaginais de natureza infecciosa (CORSELLO et al., 2003). Estima-se que aproximadamente 75% das mulheres adultas apresentem pelo menos um episódio de CVV em sua vida, sendo que destas, 40 a 50% vivenciarão novos surtos e 5% atingirão o caráter recorrente (CVVR), definido como a ocorrência de quatro ou mais episódios sintomáticos no período de doze meses (SOBEL, 2007).

Do ponto de vista do hospedeiro, a colonização prévia por levedura e posterior diminuição da capacidade de resposta imunológica observada em doenças imunossupressoras, gestantes e usuárias crônicas de corticóides, parecem favorecer a infecção. Ainda parecem contribuir o uso de antibióticos, estrogenoterapia, pequenos traumas como o ato sexual, hábito de usar roupas muito justas ou de fibras sintéticas, além da dieta alimentar muito ácida (FERNANDES; MACHADO, 1996). Em adição a estes fatores, existem propriedades intrínsecas das leveduras que promovem sua habilidade de causar CVV. Aderência a tecidos humanos e produção de enzimas extracelulares são atributos classificados entre os mais importantes na virulência de *Candida* sp. (FIDEL JR. et al., 2004).

Os mecanismos de aderência de leveduras à tecidos humanos ocorrem como resultado de sistemas de reconhecimento *Candida*-hospedeiro, os quais são extremamente complexos e envolvem uma variedade de fatores (GRIMAUDO; NESBITT, 1997). A aderência de leveduras às células epiteliais vaginais humanas (CEVH) é reconhecida como um passo essencial na colonização microbiana e um evento chave no processo patogênico, sendo que *C. albicans* não

aderentes causam menos doença em modelos animais (KAMAI et al., 2002). As CEVH podem ser divididas em dois tipos em mulheres em idade reprodutiva, na dependência do hormônio sexual predominante em cada fase do ciclo menstrual. As células superficiais (CS) ocorrem por ação estrogênica sobre o epitélio escamoso vaginal, enquanto que às células intermediárias (CI) da progesterogênica. Desta maneira, mudanças cíclicas destes dois hormônios refletem na mudança da razão CS/CI (BIBBO, 1997). Alguns estudos têm demonstrado maior capacidade de adesão de leveduras às CI que as CS, ratificando a influência hormonal na infecção (BORIS et al., 1998; IRIE et al., 2006; KALO; SEGAL, 1988).

A microbiota vaginal normal é constituída predominantemente por lactobacilos produtores de peróxido (bacilos de Döderlein), os quais formam ácido láctico a partir do glicogênio, presente principalmente no citoplasma das CI. Esse mecanismo propicia uma acidez adequada do ambiente vaginal (pH em torno de 4,5), dificultando a proliferação da maioria dos microrganismos que podem ser patogênicos a este sítio anatômico com exceção das leveduras, que proliferam em ambiente ácido (ALMEIDA FILHO et al., 1995). Lactobacilos são envolvidos na manutenção da microbiota vaginal normal por prevenir o supercrescimento de organismos patogênicos e oportunistas. Eles podem atuar pela ativação do sistema imune, pela competição com outros microrganismos na aderência ao epitélio vaginal, e também por produzir bacteriocinas, ácido láctico e peróxido de hidrogênio (DENNERSTEIN; ELLIS, 2001). Já foi também relatada a ocorrência de coagregação entre *C. albicans* e *Lactobacillus acidophilus*, porém pouco se sabe sobre a influência deste processo no desenvolvimento da CVV (BORIS et al., 1998).

Este trabalho teve por objetivo promover a ocorrência de co-agregação *in vitro* entre *C. albicans*, isolada de exsudato vaginal de paciente com CVV, e *Lactobacillus acidophilus*, e avaliar a sua influência sobre a capacidade de adesão dos microrganismos às CEVH, tanto CS quanto CI.

Material e métodos

Leveduras

Foi utilizado um isolado de *Candida albicans* de exsudato vaginal. Esta amostra foi identificada por métodos clássicos (KURTZMAN; FELL, 1998) e de biologia molecular (SUGITA et al., 2002). A levedura encontra-se estocada em água destilada com glicerol a 10% (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), sob refrigeração a 4°C, no banco de leveduras do Setor de Micologia Médica do Laboratório de Ensino e Pesquisa em

Análises Clínicas (Lepac) da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná.

Para cada experimento, a levedura foi reativada (24 h^{-1}) em Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Difco, Detroit, USA) a 25°C . Após reativação, foi confirmada sua identificação e pureza. A partir do crescimento fúngico, foi semeada uma alçada em $3,0\text{ mL}$ de Yeast Nitrogen Base (YNB broth-Difco, USA) suplementado com 50 mM de galactose e incubado a 37°C por 24h. O crescimento fúngico foi centrifugado a 1500 rpm durante 5min, desprezado o sobrenadante e o sedimento lavado três vezes com $5,0\text{ mL}$ de salina tampão fosfato (PBS- $0,01\text{ M}$, pH 7,2). Este sedimento foi suspenso em solução salina estéril a 0,85% (SSE) em tubo de vidro ($13 \times 100\text{ mm}$), submetido à agitação em Vortex (AP56 Phoenix, Brasil). Em seguida, foram preparadas suspensões com concentração de $1\text{ a }2 \times 10^7\text{ leveduras mL}^{-1}$ por meio da contagem em câmara de Neubauer. Esta suspensão foi utilizada para o ensaio de aderência das leveduras as CEVH.

Bactérias

Foi utilizado um isolado de *L. acidophilus* (ATCC 4356), mantido em TSB (Difco, Detroit, USA) adicionado de 10% de glicerol, sob refrigeração a 4°C . Para cada experimento, a bactéria foi reativada (72h) em Rogosa S.L. Ágar (Difco, Detroit, USA) (ROGOSA et al., 1951). Após incubação de 72h 37°C^{-1} em microaerofilia, foi preparada uma suspensão de *L. acidophilus* com SSE em tubo de vidro com tampa, submetido à agitação em Vortex (AP56 Phoenix, Brasil). Sua turbidez correspondeu a 0,08-0,1 de Absorbância a 625 nm , em espectrofotômetro. O resultado foi uma suspensão de bactérias com concentração de $1 \times 10^8\text{ bactérias mL}^{-1}$. Esta suspensão foi utilizada para o ensaio de aderência desta bactéria as CEVH.

Ensaio de co-agregação

Suspensões contendo $1 \times 10^7\text{ leveduras mL}^{-1}$ e de $1 \times 10^8\text{ bactérias mL}^{-1}$ foram preparadas em tampão de co-agregação (tampão CoAg- $20\text{ mM Tris-HCl pH 7,8}$, $0,1\text{ mM CaCl}_2$, $0,1\text{ mM MgCl}_2$, $0,015\text{ M NaCl}$, $0,02\%\text{ NaN}_3$). Iguais volumes ($500\text{ }\mu\text{L}$) da suspensão de levedura e de lactobacilos foram colocados em contato e incubados a 37°C sob agitação a 100 rpm por 4h. A co-agregação foi avaliada à microscopia óptica comum, 1 e 4h após a incubação e considerada positiva quando observada a presença de agregados formados pela interação levedura-lactobacilo (BORIS et al., 1998).

Obtenção e preparo das células epiteliais vaginais (CEVH)

As células vaginais foram coletadas de doadora saudável, não usuária de anticoncepcional hormonal,

entre o 10 e 15º dia do ciclo menstrual. Foi utilizado espéculo vaginal e realizada uma raspagem da parede lateral da vagina com espátula de Ayre esterilizada. O material foi suspenso em $10,0\text{ mL}$ de tampão salina fosfato $0,01\text{ M}$, pH 7,2 (PBS) e centrifugado a 1500 rpm durante 5 min. Foram lavadas três vezes com o mesmo volume de PBS. O sedimento foi examinado ao microscópio óptico para descartar possível contaminação por leveduras. A suspensão final em PBS correspondia a $2 \times 10^5\text{ CEVH mL}^{-1}$, contadas em câmara de Neubauer. O ensaio de aderência foi iniciado em no máximo 30 minutos após coleta (IRIE et al., 2006) (Copep/UEM; aceite n. 013/2002, CI nº 032/02).

Ensaio de aderência em células epiteliais vaginais humanas

Volumes iguais ($0,5\text{ mL}$) da suspensão de CEVH e de células fúngicas, bacterianas e do co-agregado de 4h foram incubados em tubo côncico de vidro, a 37°C 1h^{-1} , sob agitação a 70 rpm em Shaker (Modelo NT 712, Nova Técnica). Foi realizada centrifugação a $1500\text{ rpm 5 min.}^{-1}$ e o sedimento lavado 5 vezes com $3,0\text{ mL}$ de PBS para remoção dos microrganismos não aderidos. Na última lavagem, o sobrenadante foi desprezado por inversão e um volume de $50\text{ }\mu\text{L}$ foi delicadamente espalhado sobre lâmina de vidro $26 \times 76\text{ mm}$ e deixando secar a temperatura ambiente. Após, as lâminas foram coradas com cristal violeta por 1 min., lavadas com água e imediatamente coradas por Papanicolaou. O experimento foi realizado em triplicata, em três dias distintos (IRIE et al., 2006). As CEVH foram diferenciadas em CS ou CI por sua morfologia e coloração ao Papanicolaou. CI são poligonais, apresentam núcleo vesicular oval ou redondo bem definido e citoplasma corado de azul, verde ou violeta. CS são também poligonais, com núcleo picnótico e citoplasma frequentemente rosa, algumas vezes azul pálido (BIBBO, 1997).

Critérios de leitura da adesão

Os esfregaços foram examinados em microscópio óptico comum, aumento de 400 x , para determinar os microrganismos aderidos às CEVH. Para cada experimento, o número de leveduras (a), de lactobacilos (b) ou de ambos os microorganismos co-agregados (c) aderidos a 600 CEVH (300 células superficiais-CS e 300 células intermediárias-CI) foram contados. Somente a, b e c que estavam em contato direto com as CEVH foram considerados como aderidos e então contados. Leveduras em brotamento ou pseudo-hifas foram consideradas como uma unidade fúngica. As contagens foram realizadas em regiões do esfregaço onde não havia sobreposição celular ou artefatos de coloração (IRIE et al., 2006).

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A MEV foi realizada com os microrganismos, *C. albicans*, *L. acidophilus* e co-agregados, antes e após a realização do ensaio de aderência às CEVH. Os sedimentos resultantes foram fixados em solução de glutaraldeído 2,5% dissolvido em tampão cacodilato 0,1 M (Sigma Chemical Co., USA) e desidratados em série crescente de solução alcoólica. O ponto crítico foi obtido em Balzers CPD-010 (Balzers instruments, Balzers, Liechtenstein) com gás carbônico. Em seguida foi feita a metalização em ouro em Balzers SCD-030 (Balzers Instruments, Balzers, Liechtenstein). A documentação foi realizada em microscópio eletrônico de varredura JEOL-JSM 6360 LV (Jeol Ltda., 33 Tokyo, Japan) no Centro de Microscopia Eletrônica, Universidade Federal do Paraná.

Análise estatística

Os resultados foram analisados usando teste t e teste de Turkey para múltiplas comparações da adesão nas diferentes situações experimentais. O nível de significância foi fixado em 5%. Os testes foram realizados no software Graph Pad Prism® versão 3.0 (Graph Pad Software Inc.).

Resultados e discussão

Co-agregação

A co-agregação ocorreu já a partir de 1h de incubação, na forma de pequenos e grandes agregados claramente visíveis à microscopia comum (Figura 1).

Essa interação foi comprovada pela análise ultraestrutural por MEV (Figura 2). Foram observados grandes agregados (2A e 2B) e íntima interação entre os microrganismos (2B). *C. albicans* co-agrega na forma de blastoconídio (2A e 2B) e também em brotamento (2A), o que sugere que a levedura estava viva e multiplicando-se.

Estudos *in vivo* com pacientes saudáveis já demonstraram que lactobacilos co-agregam com outros componentes da flora vaginal e uropatógenos potenciais (REID et al., 1990). Foi proposto que este processo seria uma das formas dos lactobacilos neutralizarem microrganismos uropatógenos, mantendo o balanço ecológico e inibindo o desenvolvimento de infecções (SWEET et al., 1987). A co-agregação pode impedir o acesso de patógenos à receptores celulares e inibir a sua adesão, que é fundamental para a colonização e desenvolvimento de microrganismos como *C. albicans* (BORIS et al., 1998).

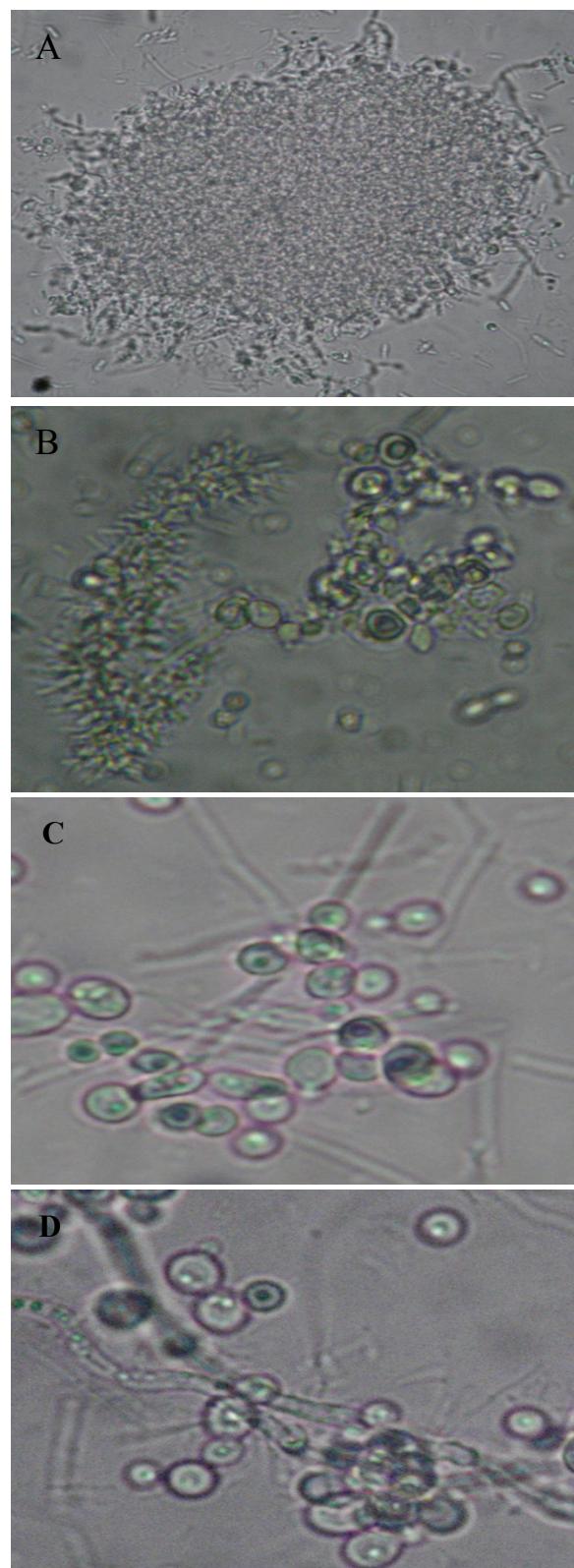


Figura 1. Microscopia óptica comum dos co-agregados formados entre *Candida albicans* e *Lactobacillus acidophilus* em cultivo líquido a partir de 1h deincubação. A e B) Grandes co-agregados. C e D) Maiores detalhes dos co-agregados mostrando a interação entre os microrganismos. Aumentos de 100 x (A), 200 x (B) e 400 x (C e D).

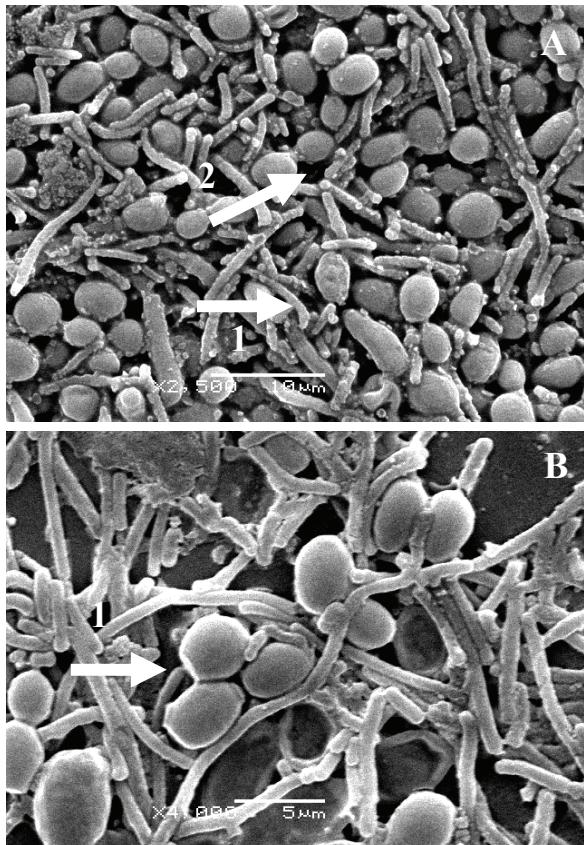


Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do co-agregado entre *C. albicans* e *L. acidophilus* após incubação por 48h 37°C⁻¹ sob agitação a 100 rpm. Em A e B podem ser observados grandes co-agregados e em B detalhes da íntima interação entre os microrganismos. *C. albicans* co-agregou na forma de blastoconídios (seta 1) e de brotamentos (seta 2). Barra de 10 μm (A) e 5 μm (B).

Aderência

Todos os ensaios de aderência foram reprodutíveis ($p > 0,05$). *C. albicans* e *L. acidophilus* isoladamente apresentaram elevada capacidade de aderir as CEVH, tanto CS quanto CI, sem diferença na capacidade de adesão de ambos os microrganismos sobre CS ou CI ($p > 0,05$) (Figura 3). Segundo Irie et al. (2006), a maioria dos isolados de *C. albicans*, mas não todos, apresentam maior adesão às CI.

L. acidophilus aderiu significativamente mais na suspensão em que estava sozinho que após co-agregação ($p < 0,001$). Por outro lado, as leveduras tiveram sua capacidade de aderência aumentada após co-agregação ($p < 0,001$) (Figuras 3 e 4). Ambos os microrganismos continuaram não apresentando diferença na capacidade de adesão em CS ou CI após co-agregação ($p > 0,05$) (Figura 4). Estudo realizado por Chassot et al. (2010) apresentou resultados semelhantes de co-agregação entre *C. albicans* e

L. acidophilus e de adesão em anel vaginal contraceptivo como superfície abiótica.

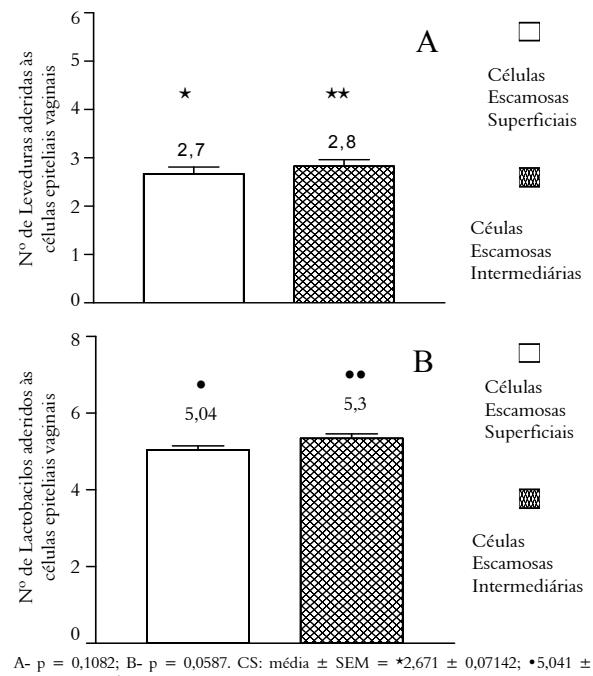
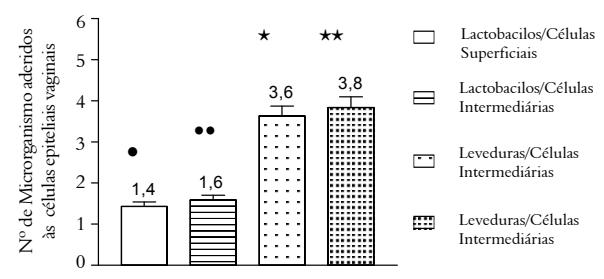


Figura 3. Número de leveduras e de lactobacilos em ensaios isolados aderidos às células epiteliais vaginais humanas (CEVH), superficiais (CS) e intermediárias (CI). A) Leveduras aderidas. B) Lactobacilos aderidos.



CS: média ± SEM = •1,434 ± 0,05512; *3,632 ± 0,1223; CI: média ± SEM = ••1,589 ± 0,05837; **3,837 ± 0,1338. • e .. = $p > 0,05$; • e ** = $p > 0,05$; • e * = $p < 0,001$; • e ** = $p < 0,001$; .. e * = $p < 0,001$. • e **, .. e **, .. e * = $p < 0,001$.

Figura 4. Número de microrganismos (leveduras e lactobacilos) aderidos as células epiteliais vaginais humanas (CEVH), superficiais (CS) e intermediárias (CI), após ensaio de co-agregação de 4 horas.

Na Figura 5 podem ser observados detalhes da aderência dos microrganismos as CS e CI diferenciadas por Papanicolaou.

Os resultados obtidos sugerem que a utilização de probióticos à base de *L. acidophilus* não protegeria o evento da adesão de *C. albicans* aos dois tipos celulares de CEVH, ao contrário, poderia favorecer sua ocorrência, o mesmo para superfícies abióticas. Considerando que haja correlação desses achados com a interação que

ocorre *in vivo*, uma flora lactobacilar vaginal também não protegeria da infecção por *C. albicans*. Neste contexto, *L. acidophilus* foi utilizado neste ensaio por ser uma das espécies de lactobacilos mais comumente isolados da microbiota vaginal (STRUS et al., 2005; FALAGAS et al., 2006) e por ser empregado como probiótico em alimentos convencionais (leite e iogurte), suplementos alimentares e também em formas farmacêuticas de utilização vaginal contra infecções urogenitais (SANDERS; KLAENHAMMER, 2001).

Entretanto, deve ser considerado que o processo de adesão é multi-fatorial e ocorre como resultado de sistemas de reconhecimento *Candida*-hospedeiro e consequentemente *Candida*-superfície de adesão, os quais são extremamente complexos e envolvem uma grande variedade de receptores e fatores (GRIMAUDO; NESBITT,

1997). Boris et al. (1998) encontraram resultados diferente dos nossos, sendo que em seu estudo a co-agregação entre *C. albicans* e *L. acidophilus* diminuiu a adesão da levedura às células vaginais. Porém, as CEVH analisadas não foram separadas em CS e CI, o que pode ser a causa dos diferentes resultados entre os estudos.

A MEV comprovou a aderência de *C. albicans*, *L. acidophilus* e co-agregados destes microrganismos sobre as CEVH (Figuras 6 e 7).

As Figuras 6A e B mostram *C. albicans* e *L. acidophilus*, respectivamente, aderidos nas CEVH. Na Figura 7 podem ser observados vários aspectos da adesão dos co-agregados as células. Em 7A e B são observados co-agregados perfeitamente alojados na superfície celular e em 7B maiores detalhes da interação entre os microrganismos e sua adesão as CEVH.

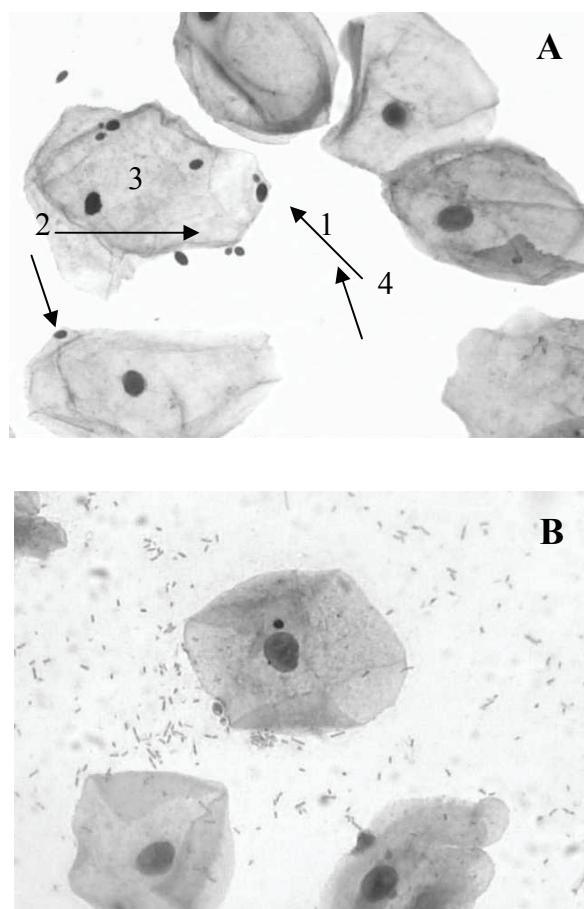


Figura 5. Características da adesão de *C. albicans* e *L. acidophilus* em CEVH superficiais e intermediárias diferenciadas pela coloração de Papanicolaou. Em A leveduras e brotamento aderidas as CS (setas 1 e 2) e em B levedura em brotamento (seta 3) e lactobacilo (seta 4) aderidos a CI. Aumento de 400 X (A e B).

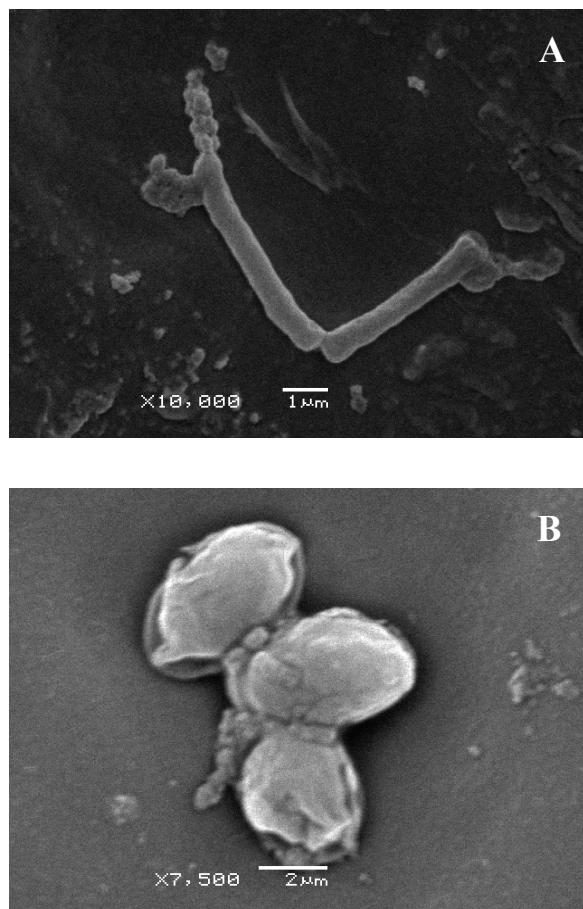


Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de *C. albicans* e *L. acidophilus* aderidos individualmente as CEVH após incubação a 37°C 1h⁻¹, sob agitação a 70 rpm. Em A, *L. acidophilus* e em B *C. albicans*, ambos aderidos à superfície celular. Barra de 1 μm (A) e 2 μm (B).

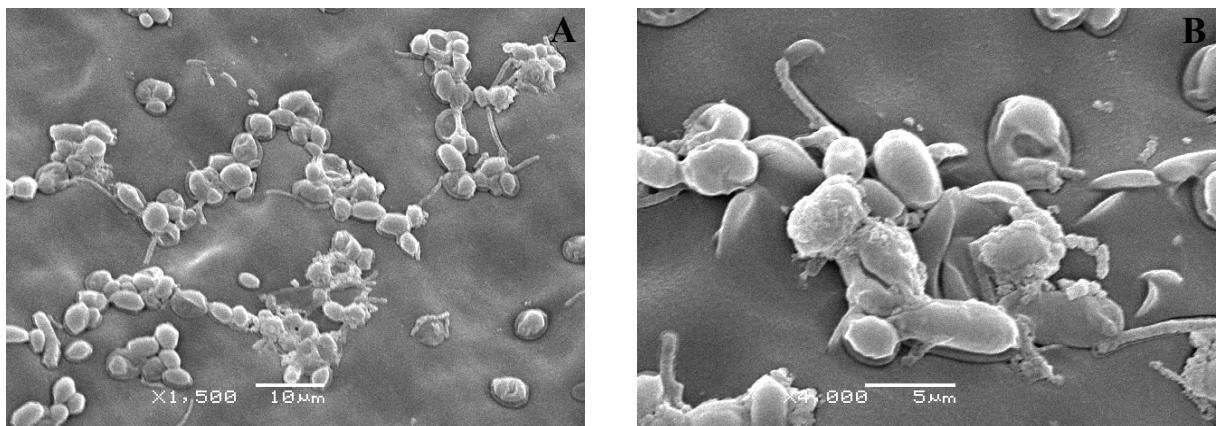


Figura 7. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos co-agregados de 4h entre *C. albicans* e *L. acidophilus* aderidos as CEVH após incubação com as mesmas a 37°C 1h⁻¹, sob agitação a 70 rpm. Em A e B são observados co-agregados perfeitamente alojados na superfície celular e em B maiores detalhes da interação entre os microrganismos e sua adesão as CEVH. Barra de 10 µm (A) e 5 µm (B).

Conclusão

No presente estudo, nós indicamos que a coexistência e co-agregação entre *C. albicans*, maior agente de CVV, e *L. acidophilus*, leva a um aumento significativo na adesão *in vitro* das leveduras e uma diminuição dos lactobacilos as CEVH, tanto em CS quanto em CI. Havendo correlação com o que acontece *in vivo*, probióticos à base de *L. acidophilus* e mesmo uma flora lactobacilar vaginal não surtiriam efeito protetor contra a adesão de *C. albicans* as CEVH e do possível desenvolvimento de CVV. Porém, deve ser considerado que a microbiota vaginal é constituída de vários outros microrganismos que não foram testados neste estudo. Assim, pesquisas adicionais devem ser realizadas com outros microrganismos em células de diferentes doadoras.

Referências

- ALMEIDA-FILHO, G. L.; PASSOS, M. R. L.; GOUVÉA, T. V. D. Candidíase. In: PASSOS, M. R. L. (Ed.). **Doenças sexualmente transmissíveis**. 4. ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1995.
- BIBBO, M. **Comprehensive Cytopathology**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1997.
- BORIS, S.; SUAREZ, J.; VAZQUEZ, F.; BARBES, C. Adherence of human vaginal Lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. **Infection and Immunity**, v. 8, n. 66, p. 1985-1989, 1998.
- CHASSOT, F.; CAMACHO, D. P.; PATUSSI, E. V.; DONATTI, L.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Can *Lactobacillus acidophilus* influence on the adhesion capacity of the *Candida albicans* in the combined contraceptive vaginal ring (CCVR)? **Contraception**, v. 81, n. 4, p. 331-335, 2010.
- CONSOLARO, M. E. L.; ALBERTONI, T. A.; YOSHIDA, C. S.; MAZUCHELI, J.; PERALTA, R. M.; SVIDZINSKI, T. I. E. Correlation of *Candida* species and symptoms among patients with vulvovaginal candidiasis in Maringá, Paraná, Brazil. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 21, n. 4, p. 202-205, 2004.
- CORSELLO, S.; SPINILLO, A.; OSNENGO, G.; PENNA, C.; GUASCHINO, S.; BELTRAME, A.; BLASI, N.; FESTA, A. An epidemiological survey of vulvovaginal candidiasis in Italy. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproduction Biology**, v. 110, n. 1, p. 66-72, 2003.
- DENNERSTEIN, G. J.; ELLIS, D. H. Oestrogen, glycogen and vaginal candidiasis. **Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 41, n. 3, p. 326-328, 2001.
- FALAGAS, M. E.; BETSI, G. I.; ATHANASIOU, S. Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review. **Journal Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 266-272, 2006.
- FERNANDES, C. E.; MACHADO, R. B. Aspectos etiopatogênicos, diagnósticos e terapêuticos da candidíase vulvovaginal. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 7, n. 1, p. 100-104, 1996.
- FERRAZA, M. H. S. H.; MALUF, M. L. F.; CONSOLARO, M. E. L.; SHINOBU, C. S.; SVIDZINSKI, T. I. E.; BATISTA, M. R. Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia**, v. 27, n. 2, p. 58-63, 2005.
- FIDEL JR, P. L.; BAROUSSE, M.; ESPINOSA, T.; FICARRA, M.; STURTEVANT, J.; MARTIN, D. H.; QUAYLE, A. J.; DUNLAP, K. An intravaginal live *Candida* challenge in humans leads to new hypotheses for the immunopathogenesis of vulvovaginal candidiasis. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 5, p. 2939-2946, 2004.
- GEVA, A.; BORNSTEIN, J.; DAN, M.; SHOHAM, H. K.; SOBEL, J. D. The VI-SENSE-vaginal discharge self-test to facilitate management of vaginal symptoms. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 195, n. 5, p. 1351-1356, 2006.

- GRIMAUDO, N. J.; NESBITT, W. E. Coaggregation of *Candida albicans* with oral *Fusobacterium* species. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 12, n. 3, p. 168-173, 1997.
- IRIE, M. M. T; CONSOLARO, M. E. L.; GUEDES, T. A.; DONATTI, L.; PATUSSI, E. V.; SVIDZINSKI, T. I. E. A simplified technique for evaluating the adherence of yeasts to human vaginal epithelial cells. **Journal Clinical Laboratory Analysis**, v. 20, n. 5, p. 195-203, 2006.
- KALO, A.; SEGAL, E. Interaction of *Candida albicans* with genital mucosa: effect of sex hormones on adherence of yeasts *in vitro*. **Canada Journal of Microbiology**, v. 34, n. 6, p. 224-228, 1988.
- KAMAI, Y.; KUBOTA, M.; KAMAI, S.; HOSOKAWA, T.; FUKUOKA, T.; FILLER, S. G. Contribution of *Candida albicans* ALS1 to the pathogenesis of experimental oropharyngeal candidiasis. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 9, p. 5256-5258, 2002.
- KURTZMAN, C. P.; FELL, F. W. **The yeast**. A taxonomia study. Amsterdam: Elsevier, 1998.
- REESE, R. E.; BETTS, R. F. **A practical approach to infectious disease**. 3rd ed. Boston: Little, Brown and Company, 1991.
- REID, G.; MCGROARTY, A. J.; DOMINGUES, P. A. G.; CHOW, A. W.; BRUCE, A. W.; EISIN, A.; COSTERTON, J. W. Coaggregation of urogenital bacteria *in vitro* and *in vivo*. **Current Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 47-52, 1990.
- ROGOSA, M.; MITCHELL, J. A.; WISEMAN, R. F. A selective medium for the isolation and enumeration of oral lactobacilli. **Journal Bacteriology**, v. 30, n. 5, p. 682-689, 1951.
- SANDERS, M. E., KLAENHAMMER, T. R. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. **Journal of Dairy Sciences**, v. 84, n. 2, p. 319-331, 2001.
- SOBEL JD. Vulvovaginal candidosis. **Lancet**, v. 369, n. 9, p. 1961-1971, 2007.
- STRUS, M., KUCHARSKA, A.; KUKLA, G.; BRZYCHCZY-WLOCH, M.; MARESZ, K.; HECZKO, P. B. The *in vitro* activity of vaginal *Lactobacillus* with probiotic properties against *Candida*. **Infection Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 13, n. 2, p. 69-75, 2005.
- SWEET, S. P.; MACFARLANE, T. W.; SAMARANAYAKE, L. P. Determination of cell surface hydrophobicity of oral bacteria using a modified hydrocarbon adherence method. **FEMS Microbiology Letters**, v. 48, n. 1, p. 159-168, 1987.
- SUGITA, T.; KUROSAKA, S.; YAJITATE, M.; SATO, H.; NISHIKAWA, A. Extracellular proteinase and phospholipase activity of tree genotypic strains of a human pathogenic yeast, *Candida albicans*. **Microbiology and Immunology**, v. 46, n. 12, p. 881-883, 2002.

Received on May 31, 2009.

Accepted on October 15, 2009.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.