

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

**HELOISA RODRIGUES DA SILVA SANTOS
VITÓRIA DE OLIVEIRA**

FREQUÊNCIA DA CANDIDÍASE VAGINAL E O USO DE PROBIÓTICOS NO CONTROLE DA INFECÇÃO

**BAURU
2016**

**HELOISA RODRIGUES DA SILVA SANTOS
VITÓRIA DE OLIVEIRA**

**FREQUÊNCIA DA CANDIDÍASE VAGINAL E O
USO DE PROBIÓTICOS NO CONTROLE DA
INFECÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Centro de Ciências da Saúde
da Universidade do sagrado Coração para
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina, realizado sob orientação da
Profa. Dra. Silvana Torossian Coradi.

**BAURU
2016**

Santos, Heloisa Rodrigues da Silva

S2375f

Frequência de candidíase vaginal e o uso de probióticos no controle de infecção / Heloisa Rodrigues da Silva Santos; Vitória de Oliveira. -- 2016.

25f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Silvana Torossian Coradi.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.

1. Candidíase Vaginal. 2. Probióticos. 3. Candida. 4. Lactobacilos. I. Oliveira, Vitória de. II. Coradi, Silvana Torossian. III. Título.

**HELOISA RODRIGUES DA SILVA SANTOS
VITÓRIA DE OLIVEIRA**

**FREQUÊNCIA DA CANDIDÍASE VAGINAL E O
USO DE PROBIÓTICOS NO CONTROLE DA
INFECÇÃO.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Centro de Ciências da Saúde
da Universidade do sagrado Coração para
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina, realizado sob orientação da
Profa. Dra. Silvana Torossian Coradi.

Banca examinadora:

Profa Ms. Daniela Barbosa Nicolielo
Universidade do Sagrado Coração

Profa Dra Silvana Torossian Coradi.
Universidade do Sagrado Coração

Profa Dra Ana Carolina Polano Vivan
Universidade do Sagrado Coração

Bauru, 25 de novembro de 2016

AGRADECIMENTOS

Agradecemos primeiramente a Deus, pelas bênçãos concedidas e pela saúde para a realização desse estudo.

À nossa família, pela força, incentivo e paciência. À Universidade do Sagrado Coração, que possibilitou a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Biologia da Universidade pelo apoio e estruturas oferecidos.

À Bibliotecária por ter realizado a ficha catalográfica.

À Profa. Érica Boarato pela ajuda durante a realização da prática. À Fabiane e a Lígia pelo auxílio e informações fornecidas.

As participantes que disponibilizaram as amostras e responderam o questionário.

Á Alexia pela ajuda durante a prática.

Agradecemos a todos que nos apoiaram para que este estudo fosse concluído.

Obrigada!

AGRADECIMENTO PRIMORDIAL

Agradecemos a nossa querida orientadora Profa. Dra. Silvana Torossian Coradi, primeiramente por ser um exemplo maravilhoso de pessoa e profissional. Agradecemos também por toda a paciência, dedicação e compreensão, por todas as horas disponibilizadas, e principalmente por ter confiado em nós para transmitir seus conhecimentos. Agradecemos por dispor de seu ilustre nome para engrandecer esse trabalho. Agradecemos por estar sempre nos guiando, e por sua magnífica sinceridade em todos os aspectos, obrigada pelos conselhos não só acadêmicos, mas também pessoais que foram decisivos em grandes momentos durante esses quatro anos. Obrigada por ter feito parte da nossa vida!

RESUMO

Candidíases estão entre as causas frequentes de vulvovaginites em mulheres de diferentes faixas etárias. Diversos estudos têm destacado a recorrência da doença, a dificuldade de controle ou prevenção, a tendência à automedicação e a relação com a resistência ao tratamento convencional com antifúngicos. *Candida albicans* é a espécie mais isolada, mas outras espécies deste gênero têm sido cada vez mais identificadas, bem como os relatos de dificuldade de tratamento da doença vaginal. Diante deste contexto, se faz necessário terapias que possam prevenir ou controlar de modo satisfatório os casos de repetição, evitando o tratamento convencional e o risco cada vez maior de resistência aos antifúngicos. Dentre essas terapias alternativas, os probióticos representam uma possibilidade, pois são considerados alimentos funcionais que podem ser dietéticos ou suplementos alimentares, com função de atuar de forma benéfica na saúde humana. Estudos têm sugerido que os probióticos reforçam a barreira protetora de mucosa, modulando a resposta imunológica antagonizando agentes patogênicos, pela produção de antimicrobianos ou através da concorrência pelos sítios de ligação. Este estudo avaliou a ação de um probiótico liofilizado e um alimento lácteo de uso comercial sobre cepas de *C. albicans* e *C. glabrata* e observou redução do número de células leveduriformes e inibição de formas miceliais, além de manter o pH do meio na faixa satisfatória a homeostase do ambiente vaginal. Essa atividade inibitória do crescimento pode ser por competição de nutrientes, de habitat entre os dois microorganismos ou por substâncias inibidoras de crescimento do fungo produzidas pelo lactobacilo. Estudos futuros poderão elucidar o modo de ação do probiótico sobre o fungo, concentração satisfatória e até mesmo permitir o desenvolvimento de produtos de uso tópico de fácil aplicação na busca de medidas profiláticas e de controle da candidíase vaginal de repetição.

Palavras-chave: candidíase vaginal. Probióticos. *Candida*. lactobacilos.

ABSTRACT

Candidiasis are among the common causes of vulvovaginitis in women of different age groups. Several studies have highlighted the recurrence of the disease, the difficulty of control or prevention, the tendency to self-medication and the relationship with resistance to conventional treatment with antifungals. *Candida albicans* is the most isolated species, but other species of this genus have been increasingly identified, as well as reports of difficulty in treating vaginal disease. Against this background, therapies are needed that can prevent or control cases of repetition satisfactorily, avoiding conventional treatment and increasing risk of resistance to antifungal drugs. Among these alternative therapies, probiotics represent a possibility because they are considered functional foods that can be dietary or dietary supplements, with the function of acting in a beneficial way in human health. Studies have suggested that probiotics enhance the mucosal protective barrier by modulating the immune response by antagonizing pathogens, by producing antimicrobials or by competition for binding sites. This study evaluated the action of a lyophilized probiotic and a commercial dairy food on strains of *C. albicans* and *C. glabrata* and observed a reduction in the number of yeast cells and inhibition of mycelial forms, besides maintaining the pH of the medium in the satisfactory range The homeostasis of the vaginal environment. This growth inhibitory activity may be by competition of nutrients, habitat between the two microorganisms or by fungus growth inhibitory substances produced by lactobacillus. Future studies may elucidate the mode of action of the probiotic on the fungus, satisfactory concentration and even allow the development of topical products of easy application in the search for prophylactic measures and control of recurrent vaginal candidiasis.

Keywords: vaginal candidiasis. Probiotics. *Candida*. lactobacilli.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Amostra de secreção vaginal incubadas em ágar Sabouraud-dextrose a 35°C. Em (A) colônia de leveduras característica do gênero *Candida*, e (B) colônia cremosa de cor rosada característica de levedura do gênero *Rhodotorula*. 24

Figura 2- Relação de amostras de secreção vaginal, semeadas em ágar Sabouraud-dextrose, com crescimento de leveduras do gênero *Candida*, crescimento de contaminantes e de não crescimento de fungos. 25

Figura 3- Relação de parâmetros obtidos do questionário e sua associação de leveduras do gênero *Candida* em isolados de secreção vaginal. 27

Figura 4- Macrodiluição em caldo BHI (Brain Heart Infusion) de *Candida albicans* tratada com probiótico a 5%. Observar a presença de pseudo-hifas curtas. 28

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Relação de parâmetros clínicos e comportamentais declarados, associados à candidíase vaginal. 26
- Tabela 2:** Descrição da média de crescimento da levedura *Candida albicans* e *C. glabrata*, submetidos a contagens após 24 e 48 horas de incubação depois de tratados com o probiótico *Lactobacillus casei*. 29
- Tabela 3:** Descrição da média de crescimento da levedura *Candida albicans* e *C. glabrata*, submetidos a contagens após 24 e 48 horas de incubação depois de tratados com o leite fermentado tipo Yakult®. 29
- Tabela 4:** Descrição de valores de pH medidos após 24 e 48 horas de incubação de *Candida albicans* e *C. glabrata* tratados com o probiótico *Lactobacillus casei*. 30
- Tabela 5:** Descrição de valores de pH medidos após 24 e 48 horas de incubação de *Candida albicans* e *C. glabrata* tratados com o leite fermentado tipo Yakult®. 31

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC- American Type Culture Collection

CVV- candidíase vulvovaginal

INCQS- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

mL- mililitro

pH- potencial hidrogeniônico

μL- Microlitros.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3. MATERIAL e MÉTODO.	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
REFERÊNCIAS	32
APENDICE A- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	36
APÊNDICE B- Frequência da candidíase vaginal e o uso de probióticos no controle da infecção	37
ANEXO A- Aprovação comitê de ética	38

1. INTRODUÇÃO

Candidíases se caracterizam como síndromes clínicas causadas por leveduras do gênero *Candida*, que compreende aproximadamente 200 espécies diferentes, encontradas em diferentes áreas do corpo, como pele, orofaringe, cavidade bucal, secreções brônquicas, vagina, urina e fezes. Entre as espécies que compõem esse gênero, podemos mencionar *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. (LACAZ, 1980; KURTZMANN, 1998; FEUERSCHUETTE et al., 2010).

Várias espécies de *Candida* são constituintes da microbiota humana, com destaque para *C. albicans*, que é a espécie mais frequente nos casos de doença causada pela levedura. A maioria dos estudos mostra que esta espécie constitui 60% dos isolados de amostras clínicas, uma vez que é parte da biota de diversos tecidos humanos. Outras espécies também podem ser patogênicas, porém com menor frequência, entre elas: *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* e *C. guilliermondii*. As espécies *C. glabrata* e a *C. krusei* apresentam resistência ao antifúngico fluconazol, por isso têm sua ocorrência associada a casos de infecções hospitalares, devido ao uso deste fármaco em ambiente hospitalar. (KAUFFMAN, 2011).

Como colonizantes, essas espécies não causam infecções a não ser que haja um desequilíbrio nos mecanismos de defesa ou fatores externos, como por exemplo, o uso de antimicrobianos que podem alterar a microbiota normal de cada sistema. Doenças causadas por fungos ganharam maior atenção nas últimas décadas principalmente com o advento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida-Aids, avanços nas terapêuticas de doenças de base, maior uso de antibacterianos, aprimoramento de técnicas de transplantes e condições que afetam diretamente o sistema imunológico. (BARBEDO e SGARBI, 2010).

As leveduras do gênero *Candida* são consideradas fungos dimórficos por apresentarem morfologia distinta em diferentes condições de crescimento. Ocorre formação de blastoconídeos em processos de colonização e forma filamentosa, identificadas como pseudo-hifas e hifas verdadeiras, em falhas do sistema imunológico. (CHAFFIN, 1998). No entanto, a espécie *glabrata* não é considerada um fungo dimórfico por não apresentar pseudo-hifas em temperaturas acima de 37°C e quando inoculada em ágar Saboraud, forma colônias homogêneas, brilhantes, de coloração creme. (FIDEL, 1999).

Estudos morfológicos comparativos das espécies de *Candida* através de cultivos realizados em ágar-fubá, incubados a 25°C, de 24 a 72 horas, demonstraram que *C. albicans* caracteriza-se por apresentar clamidoconídios globosos, terminais, de parede celular espessa, às vezes em grande número. O pseudo-micélio é abundante e ramificado e o micélio verdadeiro pode ser encontrado nos cultivos mais velhos. A hifa verdadeira possui vários septos, ao contrário das pseudo-hifas, que os mostra em número escasso. (LACAZ, 1980).

As leveduras do gênero *Candida* crescem em ágar Sabouraud-dextrose, meio acrescido de glicose e peptona, possuindo caráter não seletivo, permitindo o crescimento de colônias de fungos patogênicos e não patogênicos. O período de incubação no ágar é de no mínimo três dias a 25°C. Muito embora o pH levemente ácido do meio possa exercer relativo efeito inibidor de crescimento de alguns microorganismos, recomenda-se a adição de antimicrobianos em culturas realizadas de material biológico coletado de pacientes, para eliminar bactérias ou fungos contaminantes. Para inibir o crescimento de bactérias no ágar recomenda-se a adição de cloranfenicol; antibiótico de amplo espectro de ação, custo relativamente baixo e que suporta elevadas temperaturas, e deste modo, mantém sua eficácia no processo de autoclavagem, necessário a todo processo de cultivo in vitro. (MADHAVAN et al. 2011).

Para identificação das espécies de *Candida* podem ser utilizado métodos que avaliam assimilação e fermentação de diferentes açúcares, identificados como auxanograma e zimograma, respectivamente, ou do cultivo em CHROMagar *Candida*, onde as principais espécies da levedura desenvolvem cor característica. O uso desta metodologia permite o crescimento e identificação de *C. albicans* pelo desenvolvimento de cor esverdeada, *C. tropicalis* revela coloração azulada e a *C. krusei* adquire coloração rosada. (SIDRIM, 2004).

O crescimento da levedura em ambiente laboratorial ocorre na presença de condições ideais de nutrientes, umidade, temperatura e pH. A temperatura pode variar de 25 a 37°C, e como se desenvolvem em pH que variam de 2 a 11, podem se desenvolver praticamente em qualquer ambiente corporal. (LIANOS, 2006).

Candida sp. pode produzir vários fatores de virulência com destaque para as proteinases e lipases, que irão contribuir para a lesão celular e invasão de tecidos no hospedeiro. Dentre as muitas lesões decorrentes da contaminação e infecção por essas

leveduras, a candidíase vaginal (CV) tem grande frequência e elevada morbidade. O seu desenvolvimento, no entanto, depende de uma combinação de fatores ligados ao hospedeiro e ao micro-organismo e em especial a queda de imunidade local. (LEVINSON, 1998; SIDRIM, 2004).

É considerada candidíase vaginal quando a levedura rompe as barreiras protetoras da vagina e invade a mucosa, causando doença e sintomas. Esta condição predisponente ocorre em determinadas condições, tais como gravidez, uso de anticoncepcionais orais de alta dosagem, diabetes *mellitus* descompensado, uso de corticoides, imunossopressores e antibióticos. Também pode ocorrer candidíase vaginal no caso de alterações do sistema imunológico, com determinados hábitos de higiene, uso de roupas apertadas, pequenos atritos como o do ato sexual, contato com alérgenos e/ou irritantes da genitália. Isso sugere uma possível interferência na frequência de candidíase vulvovaginal por fatores exógenos. (FERNANDES; MACHADO, 1996; NARDIN, 2000; ROSA; RUMEL, 2004; ANDRIOLI et al., 2009).

Para haver um equilíbrio da microbiota vaginal é necessária uma adequação entre o metabolismo microbiano, os hormônios e a resposta imune do hospedeiro. No trato genital feminino, a microbiota normal é influenciada pelos hormônios sexuais e a população lactobacilar cresce devido a um aumento dos estrógenos que, conseqüentemente, acarretam o acúmulo de glicogênio nas células que revestem a mucosa. Por outro lado, na menopausa, após a redução de produção hormonal, ocorre redução das camadas epiteliais da mucosa genital predispondo a formação de escoriações e fissuras, que podem facilitar a aderência e contaminação de leveduras do gênero *Candida* e bactérias. (GONÇALVES, 2005; RIBEIRO et al., 2007). Já presença do *Lactobacillus acidophylus* garante um pH ácido, entre 3,5 e 4,5, devido à produção de ácido láctico e peróxido de hidrogênio. Esta acidez inibe o crescimento de patógenos, garantindo um estado de equilíbrio e ausência de sinais e sintomas de infecção genital. Uma mudança do ambiente facilita que a mucosa vaginal seja colonizada por bactérias patogênicas, predispondo a infecções genitais. (HASENACK et al., 2006). O desequilíbrio dos micro-organismos da biota pode favorecer o crescimento da bactéria *Gardnerella vaginalis*, acarretando prurido, disúria, corrimento abundante, homogêneo, branco-acinzentado, de odor fétido, caracterizando um quadro de vaginose. (GIRALDO, 2007).

Os casos de vaginite podem ser decorrentes da infecção por *Trichomonas vaginalis*, um protozoário flagelado que possui apenas a morfologia de trofozoíto. O parasita é um organismo anaeróbico facultativo, anaeróbico e crescimento em pH entre 5,0 a 7,5 e em temperaturas variando de 20 a 40°C. A vaginite se apresenta com abundante corrimento amarelado, espumoso e mucopurulento, de odor fétido e prurido vulvar com edema e eritema da mucosa vaginal e cérvix e dores abdominais. (MACIEL et al., 2004).

Candidíase vulvovaginal é uma inflamação da mucosa genital causada por várias espécies de leveduras, mais comumente *C. albicans*; que está entre os principais problemas ginecológicos que afetam mulheres em idade reprodutiva. Atinge vulva, vagina e epitélio escamoso do colo uterino. A leucorréia apresenta coloração branca, amarelada, acinzentada ou esverdeada, com característica semelhante a leite coalhado; pode ocorrer disúria, prurido, desconforto vulvar e dispareunia. (BASTOS et al., 2003; BRASIL, 2010).

As infecções por *Candida* no trato genital tem prevalência significativa em mulheres na idade reprodutiva, e diversos estudos confirmam frequência superior a 40% entre os 20 e 35 anos. Ao se verificar o número de casos da micose em crianças, observou-se índice inferior a 10% e de 4 a 6% em mulheres na menopausa. (BASTOS et al. (2003); MENDES et al. (2005); BOATTO et al. (2007); RIBEIRO et al., 2013). Essa prevalência da infecção nas diferentes faixas etárias pode ser justificada pela quantidade de hormônio feminino em mulheres jovens, em que se observa hiperestrogenismo devido ao uso de contraceptivos orais. Esses hormônios favorecem o aumento de glicogênio nas células da mucosa, servindo de substrato para o crescimento da levedura. Os altos índices hormonais associados às escoriações da mucosa decorrentes da relação sexual justificam o aumento de casos da candidíase nessa faixa etária. (SOBEL et al, 1998; DENNERSTEIN, 1998; FERNANDES, 1998).

Tem se observado um aumento na ocorrência de candidíase vulvovaginal causada por espécies de *Candida* não *albicans* e a causa deste aumento pode estar relacionado ao uso de antifúngicos, muitas vezes por longo período sem um critério e indicação. (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; ALVAREZ et al. 2007).

Existe uma variedade de drogas antifúngicas que podem ser administrados nos casos de *Candida* vulvovaginal, por via oral ou por via tópica vaginal. Os antifúngicos intravaginais apresentam maior frequência de reações secundárias como irritação, ardor,

prurido, do que os administrados por via oral, embora efeitos como dor de cabeça e desconfortos gastrointestinais também relatados. (GONZÁLES et al. 2011).

Os principais antifúngicos empregados no tratamento da CVV são os azóis, os agentes poliênicos como a nistatina e algumas formulações contendo anfotericina B. Os azóis são divididos em agentes imidazólicos e triazólicos, entre eles fluconazol, miconazol, clotrimazol, voriconazol, tioconazol, isoconazol, terconazol, itraconazol e cetoconazol. (RIBEIRO et al. 2004; FERRAZA et al. 2005; SOONG & EINARSON, 2009). Os derivados dos azóis atuam sobre o ergosterol, principal esterol presente na membrana plasmática dos fungos. O ergosterol está envolvido em várias funções celulares como a fluidez e integridade da membrana e no funcionamento de várias enzimas que se ligam à membrana da célula do fungo, como a quitina sintetase, enzima importante para o crescimento e divisão celular. (RIBEIRO et al. 2004; MARIE; WHITE, 2009).

Dentre os fármacos, o fluconazol é o mais recomendado na terapêutica da CVV, principalmente na candidíase vulvovaginal recorrente, porém, algumas das limitações mais relevantes do fluconazol incluem a sua inatividade contra fungos filamentosos, a resistência intrínseca da *C. krusei*, a resistência facilmente adquirida em certas espécies, nomeadamente a *C. glabrata*, além da sua hepatotoxicidade. (BAGG et al. 2005). O medicamento voriconazol tem sido considerado uma opção ao fluconazol e a anfotericina B, apresenta baixa toxicidade, e pode ser administrado por via oral ou parentérica.

Casos de candidíase vaginal são muito frequentes em mulheres adultas em fase de reprodução ou após menopausa, com dados estatísticos que identificam que mais de 75% das mulheres apresentarão a infecção em pelo menos um episódio ao longo da vida. Destes casos, metade apresentarão novas ocorrências e 5% serão classificados como candidíase vaginal de repetição (CCVR). São identificados como casos de repetição quando ocorre quatro ou mais episódios num período de 12 meses. Ao contrário das mulheres que tem vaginite pela levedura de modo esporádico, os casos recorrentes não tendem a diminuir com o avanço da idade. (MARDH, et al. 2002; MARRAZZO, 2003; PATEL, 2004).

Para prevenção da CVVR, é preciso um diagnóstico precoce e tratamento cuidadoso a fim de evitar possíveis complicações. Não usar antibióticoterapia de amplo espectro por tempo prolongado e sempre procurar o ginecologista na suspeita de

qualquer um dos sintomas é umas das maneiras de se evitar a recorrência da infecção. O tratamento envolve o uso de antifúngicos como fluconazol, itraconazol e nistatina, e mesmo assim têm ocorrido muitos casos de resistência a esses medicamentos e se faz necessário a busca de alternativas que possam tratar, prevenir ou minimizar a doença. Deste modo se justifica a avaliação de probióticos como alternativa de profilaxia ou tratamento da CV e da forma de repetição. (BENTO, 2004; BRASIL, 2010).

Probióticos foram definidos como microorganismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio da biota intestinal. Atualmente define-se probióticos como suplementos de micro-organismos vivos que contribuem para melhorar o equilíbrio da biota intestinal. Algumas culturas probióticas são usadas no tratamento de distúrbios intestinais, exercem efeitos terapêuticos e auxiliam no tratamento e prevenção de infecções urogenitais, além de ação estimuladora sobre o sistema imunológico. (TAMINE, 2002).

Para um micro-organismo ser considerado como probiótico deve suportar um pH baixo, manter sua capacidade benéfica e não causar doença, não conduzir genes transmissores de resistência a antibióticos, não ser mutagênico e carcinogênico e resistir ao oxigênio. (HAVENAAR et al., 1992; MARCO et al., 2006).

A maioria dos produtos probióticos disponíveis possuem mais de 10¹⁰ UFC/g, e as cepas mais utilizadas são as de *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus plantarum*. Estes micro-organismos são encontrados normalmente nas formas liofilizados, *spray dried* ou micro encapsulados incorporados em leites fermentados. (COEURET et al., 2004).

Ainda não são esclarecidos os mecanismos pelos quais os probióticos atuam de forma benéfica na saúde humana, mas estudos sugerem que favoreça reforço a mucosa, faça a modulação da resposta imune e o antagonismo de agentes patogênicos pela produção de antimicrobianos ou através de concorrência nos sítios de ligação. (MARCO et al., 2006). Alguns estudos têm demonstrado também que o uso de probióticos por mães lactantes induzem a produção de citocinas que estimulam a função imunológica de mucosas no lactente. (CHEN et al., 2005).

Os probióticos podem auxiliar nas respostas imunológicas do tipo inespecíficas, bem como estimular o hospedeiro a produzir respostas específicas contra alérgenos, melhorando a qualidade de vida dos indivíduos. Estudos recentes demonstraram que o

consumo de iogurte com probióticos reforçam a atividade fagocitária de células de defesa inata, a produção de citocinas, ativação de linfócito T e B e ativação de células *Natural Killer*. Esse efeito é devido à capacidade do probiótico de estimular os subconjuntos de células T-helper (Th1 e Th2), propiciando uma resposta mais eficaz e equilibrada, além de favorecer o aumento das concentrações de IFN- γ , IFN- α e IL- 12. (PERDIGÓN; ALVAREZ,1992; HORI et al., 2001; CHEN et al., 2005;).

Os micro-organismos probióticos possuem atividades terapêuticas e são mais utilizados na forma de leites fermentados por serem mais fáceis e práticos de serem consumidos, o que culmina com uma melhora na qualidade de vida e na saúde dos seres humanos. A utilização de lactobacilos em cápsulas é rotineira na clínica ginecológica nos casos de candidíase vaginal de repetição, porém relativamente onerosa. Assim, alguns clínicos têm indicado o uso da bebida láctea comercial como terapia alternativa, mas ainda não existem publicações científicas que comprovem sua eficácia. (TAMINE, 2002).

Sabendo-se que o equilíbrio e a integridade vaginal se dá devido a presença de lactobacilos na biota, alguns estudos vêm demonstrando eficácia do uso de probióticos das espécies *Lactobacillus acidophylus* e *L. crispatus* na busca do equilíbrio da microbiota intestinal e vaginal. Deste modo, este estudo tem como objetivo avaliar a atividade inibitória do crescimento de leveduras do gênero *Candida*, tratadas com probióticos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a frequência de colonização por leveduras do gênero *Candida* na mucosa vaginal, em mulheres de diferentes idades, e avaliar atividade inibitória de crescimento da levedura com o uso de probióticos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diferenciar a frequência de leveduras do gênero *Candida* em colonização ou infecção vaginal após análise de dados obtidos mediante questionário.
- Avaliar efeito inibitório do probiótico *Lactobacillus casei*, sendo em estado liofilizado ou incorporado ao leite fermentado tipo Yakult®, sobre o crescimento de leveduras do gênero *Candida*, das espécies *C. albicans* (ATCC 10231) e *C. glabrata* (INCQS 40136), *in vitro*.

3. MATERIAIS e MÉTODOS.

3.1 AUTOCOLETA DE SECREÇÃO VAGINAL

Foram obtidas amostras de secreção vaginal de 46 mulheres de diferentes idades. Cada voluntária, após ter recebido todas as orientações do projeto e sua execução, recebeu um tubo de ensaio contendo 3 mL de ágar Sabouraud-glicose (meio de transporte) e um swab de algodão estéril para a autocoleta.

A autocoleta foi realizada pela manhã, ao acordar, tendo realizado higiene na noite anterior. O *swab* foi friccionado sobre a mucosa, sem a introdução do mesmo no orifício vaginal e imediatamente colocado sobre o meio de transporte.

Os tubos foram devolvidos ao Laboratório de Biociências II, da Universidade do Sagrado Coração e incubados a 30 °C por até 10 dias. Este prazo permitiu o crescimento da colônia, identificando os casos positivos para a levedura. Não havendo crescimento em até 10 dias, as coletas foram identificadas como negativas.

3.2 ANÁLISE DO QUESTIONÁRIO

A aplicação do questionário foi realizada pelos responsáveis pela pesquisa e no momento da entrega do material para a autocoleta da secreção vaginal. As voluntárias receberam toda a explicação do procedimento e objetivos do estudo, mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Os dados obtidos foram analisados com o intuito de identificar casos de colonização ou infecção genital pela levedura, além da associação com possíveis fatores que predisõem a doença. As voluntárias não foram identificadas e não tiveram qualquer tipo de prejuízo ou risco ao participar deste estudo. Todos os dados obtidos servirão somente para a análise proposta neste trabalho.

3.3 CEPA UTILIZADA

Foram utilizadas as cepas de *C. albicans* (ATCC 10231) e *C. glabrata* (INCQS 40136), mantidas pelo Laboratório de Biociências II da Universidade do Sagrado Coração. As cepas foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose, a 30 °C, 72 horas antes da realização do experimento, como modo de garantir sua viabilidade.

3.4 PROBIÓTICOS UTILIZADOS

Foram utilizados os probióticos *Lactobacillus casei shirota* da marca Yakult®, obtido no comércio convencional, tendo o cuidado de se obter amostras com o menor tempo de produção, sendo o ideal de até 10 dias e o probiótico *Lactobacillus casei* liofilizado (FAGRON, lote 000759A).

3.4.1 Probiótico *Lactobacillus casei*

O probiótico liofilizado foi diluído a 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,6, 0,3% em água destilada estéril no momento do uso.

3.4.2 Probiótico *Lactobacillus casei shirota* -Yakult®

No momento de uso, 10 mL do leite fermentado tipo Yakult® foi centrifugado por cinco minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi descartado, restando 1 mL do sedimento, que foi homogeneizado de modo a se obter maior concentração de lactobacilos. Esse sedimento foi diluído a 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,6, 0,3% em água destilada estéril também no momento do uso.

Para o experimento com *C. glabrata*, obteve-se Yakult® com 13 dias de produção e para a *C. albicans* com 11 dias.

3.5 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DA LEVEDURA

A avaliação do efeito inibitório de crescimento da levedura do gênero *Candida* pelos probióticos *L.casei* e o leite fermentado Yakult® foi realizados pelo método de macrodiluição em caldo com a adição de 2,0 mL de caldo BHI, 100 µL de inóculo da levedura ajustada na escala 0,5 de McFarland e 100 µL do probiótico diluído a 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,6, 0,3%. O controle negativo de crescimento obteve a adição de 2 mL do caldo BHI, 100 µL da suspensão de levedura e 100 µL de solução de fluconazol 10 µg/mL (FERRAZZA et al., 2005) e o controle positivo preparado com 2 mL do caldo BHI, 100 µL da suspensão de levedura e 100 µL de água deionizada estéril.

Todas as culturas foram incubadas em estufa a 30 °C e as leituras efetuadas após 24, 48 horas de incubação. (SHINOHARA et al., 2006). Todo o experimento foi realizado em câmara de fluxo laminar.

Após cada tempo de incubação foi realizada a contagem das leveduras em câmara de Neubauer para avaliação de redução no número de leveduras com a

finalidade de verificar se o probiótico acarreta diminuição do crescimento do fungo e a verificação de formação de pseudo-hifas. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas.

3.6 COMITÊ DE ÉTICA

Projeto aprovado: Número do Parecer: 1.691.586 de 23 de agosto de 2016.
(Anexo A).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo avaliou a frequência de leveduras do gênero *Candida* vaginal em mulheres de idades variando de 18 a 55 anos. Foram distribuídos 50 tubos de ensaio para a autocoleta, dos quais 46 tubos retornaram e foram considerados neste estudo.

Todas as amostras de swab vaginal obtidas foram semeadas em ágar Sabouraud-dextrose, incubadas a 35 °C por até 10 dias. Das 46 amostras, em 15 (33%) houve crescimento evidente de colônia cremosa, de cor branca amarelada característica de leveduras do gênero *Candida*, em 14 (30%) houve crescimento de fungos contaminantes, dos quais seis (42,8%) eram de colônia rosada característica de leveduras do gênero *Rhodotorula*, e em 17 (37%) não houve crescimento de micro-organismos. (Figura 1; Figura 2).

Figura 1- Inóculos de secreção vaginal em ágar Sabouraud-dextrose a 35°C. Em (A) colônia de leveduras características do gênero *Candida* e (B) colônia cremosa de cor rosada característica de levedura do gênero *Rhodotorula*.

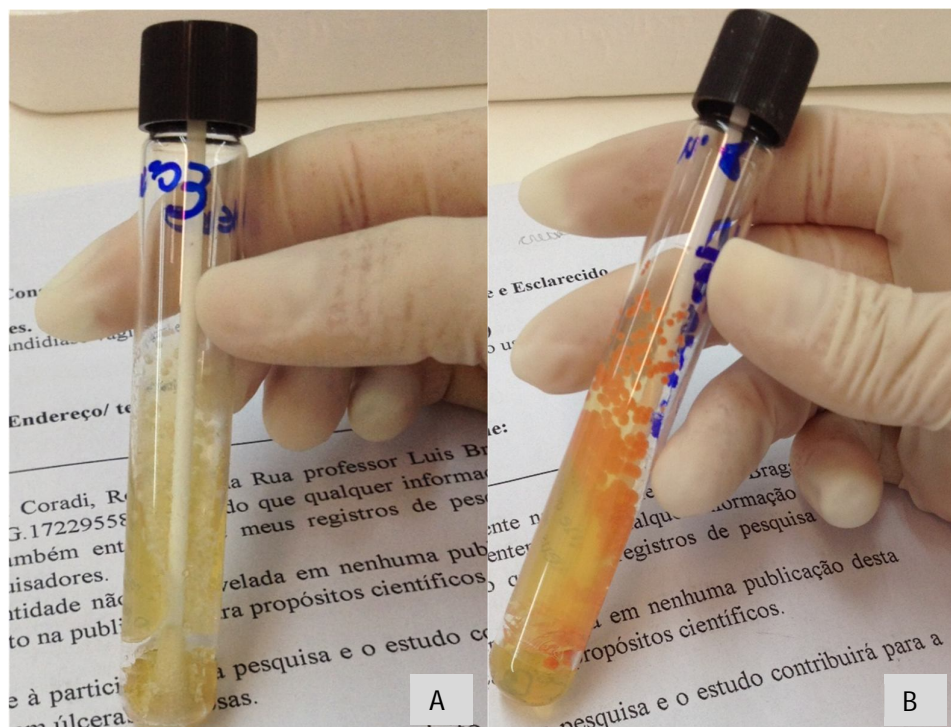
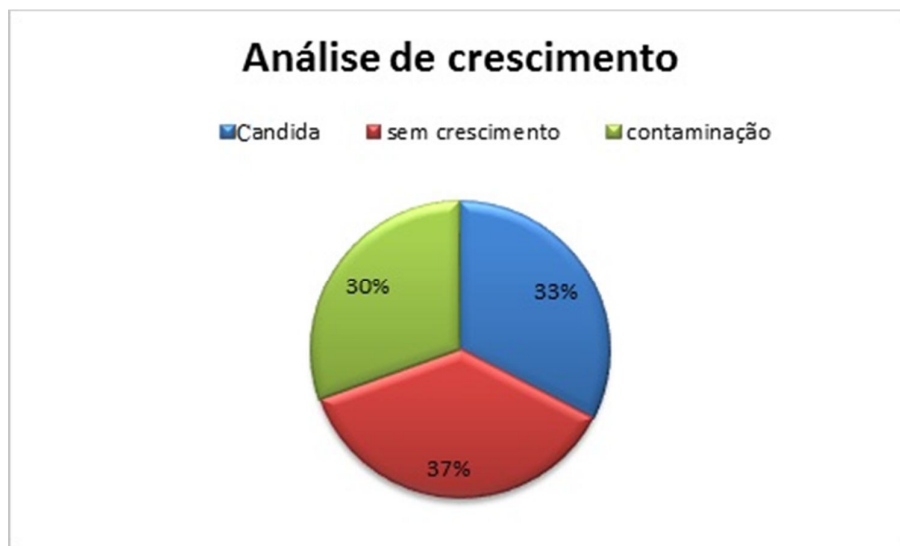


Figura 2- Relação de amostras de secreção vaginal, semeadas em ágar Sabouraud-dextrose, com crescimento de leveduras do gênero *Candida*, crescimento de contaminantes e de não crescimento de fungos.



As amostras de secreção vaginal foram obtidas de mulheres em idade fértil, e todas foram avaliadas previamente por questionário (Apêndice 1) com o objetivo de identificar hábitos e condições que possam estar associados à colonização e ou infecção vaginal pelo fungo. Das 46 análises, 28 eram de mulheres solteiras e 18 declararam ser casadas. Dentre as que relataram desconforto vaginal, quatro (30,76%) apresentaram como sintoma odor estranho, oito (61,53%) descreveram apresentar prurido e apenas uma (7%) relatou apresentar sintoma tipo alergia no período menstrual. Das 24 mulheres que disseram ter leucorréia vaginal, 17 relataram apresentar corrimento esbranquiçado, e sete descreveram corrimento de cor amarelada. Dentre as que fizeram tratamento, os medicamentos utilizados foram violeta de genciana, itraconazol, nistatina, fluconazol, metronidazol, nizoral e timidazol. O nível de escolaridade das participantes desse estudo, de 4% tinham o ensino fundamental incompleto, 8% o ensino médio incompleto, 19% tinham o ensino médio completo, 10% delas fizeram curso técnico, 30% não concluíram o ensino superior e 28% delas concluíram o ensino superior. A idade das voluntárias variou de 18 a 55 anos, sendo que apenas seis delas

tinham até 20 anos, 38 delas de 21 e 49 anos e apenas duas mulheres com 50 anos ou mais. Outros resultados obtidos estão descritos na tabela 1.

Tabela 1: Relação de parâmetros clínicos e comportamentais declarados, associados à candidíase vaginal.

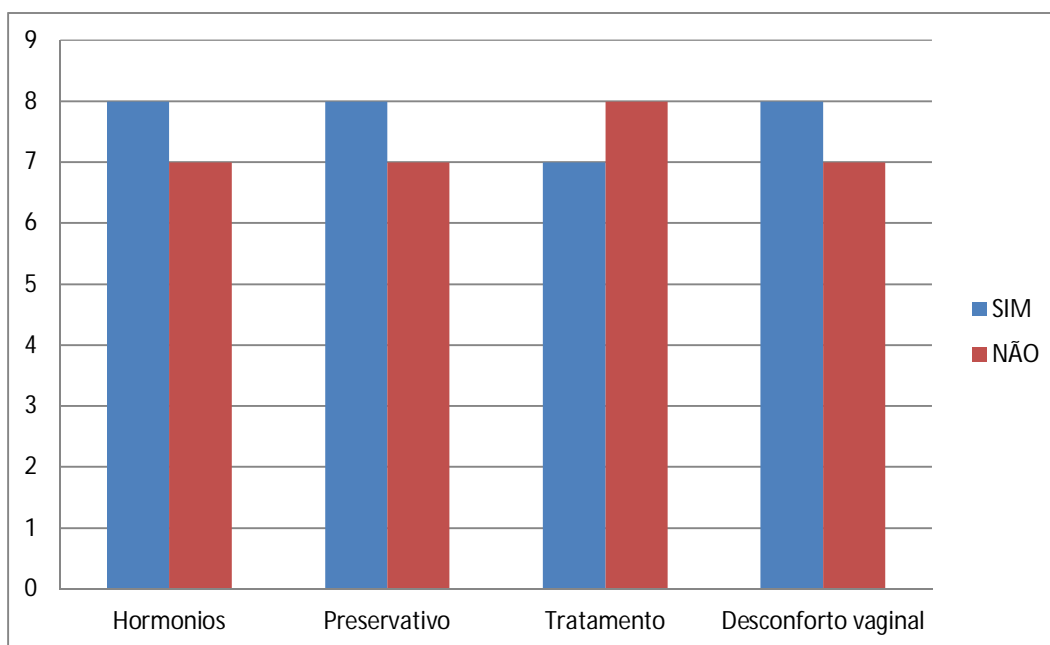
Questionamentos	SIM (%)	NÃO (%)
Gestante	0	46 (100,0)
Filhos	18 (39,13)	29 (63,00)
Usa hormônios	29 (63,00)	18 (39,13)
Usa preservativo (látex)	29 (63,00)	18 (39,13)
Diabetes	0	46 (100,0)
Uso antibiótico	24 (52,17)	23 (50,00)
Desconforto vaginal	13 (28,26)	34 (73,91)
Leucorréia	24 (52,17)	23 (50,00)
Candidíase repetição	23 (50,00)	24 (52,17)
Uso antifúngico	13 (28,26)	34 (73,91)

Ainda de acordo com dados obtidos em entrevista com voluntárias deste estudo e que tiveram isolados com características da levedura, oito (53%) faziam uso de hormônio anticoncepcional, oito (53%) utilizam preservativos de látex, sete (46%) confirmaram o uso de medicação antifúngica, e oito (53%) relataram apresentar desconforto vaginal (Figura 3).

Foram identificados 15 casos de candidíase vaginal com pelo menos um episódio da doença, e destes relatos, em 33% (cinco casos) ocorreu o crescimento da levedura na amostra. Sete mulheres relataram candidíase de repetição e destas houve crescimento do fungo em cinco inóculos e em outros dois, crescimento do gênero *Rhodotorula*. De 18 relatos de ausência de sintomas da infecção, seis apresentaram crescimento de colônia cremosa, de cor branca amarelada, característica do gênero

Candida. Podemos considerar que esses seis inóculos representam casos de colonização.

Figura 3- Relação de parâmetros obtidos do questionário e sua associação de leveduras do gênero *Candida* em isolados de secreção vaginal.



O efeito inibitório de crescimento da *C. albicans* pode ser mensurado pela diminuição do número de leveduras e ausência de pseudo-hifas, visto que o crescimento micelial caracteriza invasão tecidual. Como *C. glabrata* não desenvolve os micélios, somente o número de leveduras foi avaliado neste estudo.

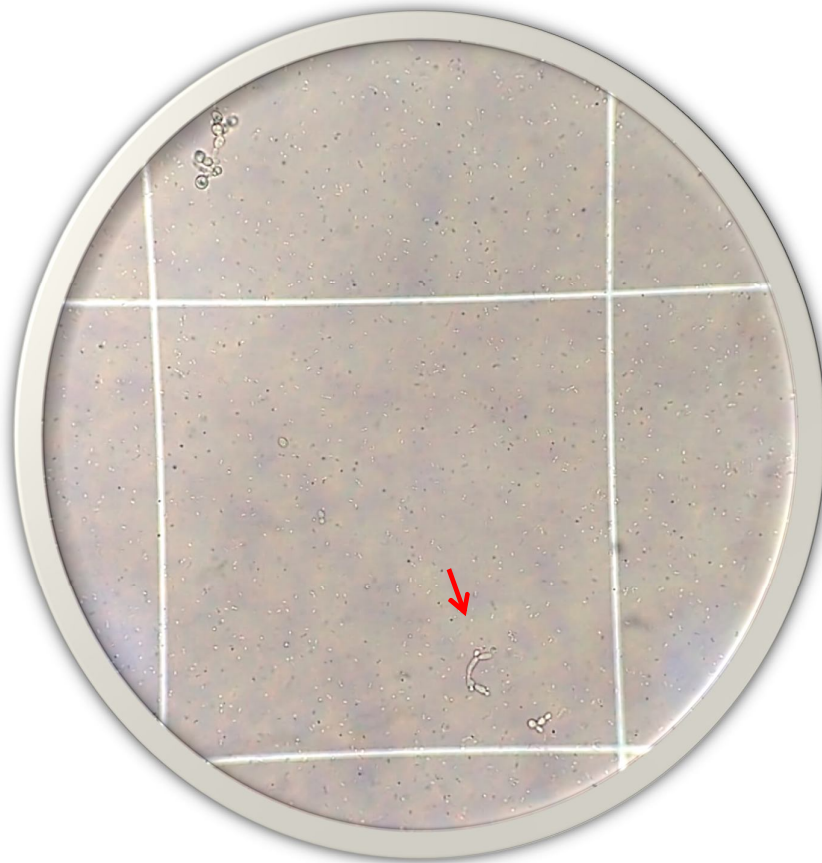
No tratamento da *C. albicans*, com o probiótico, após 24 horas de incubação não houve crescimento de pseudo-hifas nas concentrações de 20 e 10%, e na concentração de 5% houve crescimento de raras pseudo-hifas curtas, igual ao observado no controle positivo. Após 48 horas, nas concentrações de 20% e 10%, houve crescimento de raras pseudo-hifas curtas. Fato semelhante foi observado na concentração de 5% e no controle positivo. (Figura 4).

Há evidente redução de crescimento da levedura tratada com o probiótico nas concentrações de 20 e 10%. A inibição do crescimento pode ser identificada também

pela ausência de formação de pseudo-hifas nas outras concentrações. Deste modo o probiótico tem potencial como uma alternativa de prevenção e controle da doença.

Em relação à *C. glabrata*, no período de 24 horas após o tratamento com o probiótico houve inibição do crescimento da levedura nas concentrações de 20, 10 e 5% em relação ao controle positivo. Inibição de crescimento semelhante foi observada também após 48 horas de incubação. Não ocorreu inibição de crescimento da levedura nas avaliações com concentrações menores (de 2,5 a 0,3). (Tabela 2).

Figura 4- Macrodiluição em caldo BHI (Brain Heart Infusion) de *Candida albicans* tratada com probiótico a 5%. Observar a presença de pseudo-hifas curtas.



Efeito inibitório foi observado para *C. albicans* e *C. glabrata* tratadas com o leite fermentado. A inibição ocorreu para *C. albicans* na concentração de 20% e

somente nas primeiras 24 horas. A espécie de *C. glabrata* foi inibida também a 10% em 24 e 48 horas. (Tabela 3).

Tabela 2: Descrição da média de crescimento da levedura *Candida albicans* e *C. glabrata*, submetidos a contagens após 24 e 48 horas de incubação depois de tratados com o probiótico *Lactobacillus casei*.

Concentração	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida glabrata</i>	
	Probiótico 24 hs	Probiótico 48 hs	Probiótico 24 hs	Probiótico 48 hs
20%	19	39	125	578
10%	19	38	97	472
5,0%	58	141	141	648
Controle positivo	140	429	497	1003

Tabela 3: Descrição da média de crescimento da levedura *Candida albicans* e *C. glabrata*, submetidos a contagens após 24 e 48 horas de incubação depois de tratados com o leite fermentado tipo *Yakult*®.

Concentração	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida glabrata</i>	
	Yakult 24 hs	Yakult 48 hs	Yakult 24 hs	Yakult 48 hs
20%	96	316	34 (*)	509
10%	122	423	280	531
5,0%	468	986	410	864
Controle positivo	101	298	367	841

(*) valor desconsiderado por falha no experimento.

Além do número de leveduras e formação de pseudo-hifas, foi avaliado valores de pH nas diferentes concentrações, nos tempos de 24 e 48 horas de incubação, nos testes com probiótico e do leite fermentado.

Os valores de pH nas concentrações de 20 a 5 % variaram de 4,5 a 6,0 nos ensaios tratados com o probiótico e de 4,5 a 5,0 nos que tiveram a adição do leite fermentado tipo *Yakult*®. Embora os dois ensaios tenham mantido pH ácido nas concentrações maiores, a maior acidez observada no experimento com o leite fermentado pode ser decorrente da presença de alto teor de açúcar da preparação. Mesmo assim os tubos tratados com o probiótico em formulação liofilizada, também permitiu acidificar o meio. Assim, o uso do probiótico ou do leite fermentado possibilita manter o pH vaginal próximo do ideal (3,8 a 4,5) e deste modo inibir o crescimento acentuado de micro-organismos patogênicos, dentre eles as leveduras. (HASENACK et al., 2006). (Tabela 4 e 5).

O pH ácido juntamente com a maior concentração do probiótico liofilizado na preparação do inóculo, possibilitou maior inibição do crescimento da levedura. A presença de *Lactobacillus casei* e a manutenção de um pH ácido pode permitir uma controle de crescimento do fungo e prevenir casos de candidíase de repetição.

Tabela 4: Descrição de valores de pH medidos após 24 e 48 horas de incubação de *Candida albicans* e *C. glabrata* tratados com o probiótico *Lactobacillus casei*.

Concentração	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida glabrata</i>	
	Probiótico 24 hs	Probiótico 48 hs	Probiótico 24 hs	Probiótico 48 hs
pH 20%	5,0	4,5	5,0	4,5
10%	5,0	5,0	5,0	5,0
5,0%	5,0	5,0	6,0	5,0
Controle positivo	7,0	7,0	7,0	7,0

A microbiota vaginal é rica em lactobacilos que servem como uma barreira protetora, pois competem com o fungo por nutrientes, inibem os receptores epiteliais de aderência no epitélio vaginal e são capazes de produzir substâncias que inibem a formação de pseudo-hifas. (ZIARRUSTA,2002).

O efeito protetor do pH ácido sobre a mucosa vaginal é conhecido, mas este ambiente ácido não influi diretamente sobre o crescimento de leveduras, visto que elas conseguem crescer em uma grande amplitude de pH.

Tabela 5: Descrição de valores de pH medidos após 24 e 48 horas de incubação de *Candida albicans* e *C. glabrata* tratados com o leite fermentado tipo Yakult®.

concentração	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida glabrata</i>	
	Yakult 24 hs	Yakult 48 hs	Yakult 24 hs	Yakult 48 hs
pH 20%	5,0	4,5	4,5	4,5
10%	5,0	4,5	5,0	5,0
5,0%	5,0	5,0	5,0	5,0
Controle positivo	7,0	7,0	7,0	7,0

DENNERSTEIN & ELLIS (2001) sugeriram que os probióticos podem favorecer a ativação da imunidade local, competir com outros micro-organismos pela aderência ao epitélio da mucosa vaginal, e até produzir bacteriocinas, ácido láctico e peróxido de hidrogênio de efeito protetor. BORIS et al. (1998) sugeriram que o efeito protetor ocorra *in vivo* por interferir na co-agregação entre as espécies *C. albicans* e *Lactobacillus acidophilus* e a influência sobre a ocorrência da candidíase vaginal.

De qualquer modo os resultados deste estudo, ao comparar o efeito de inibição após 24 e 48 horas sugerem a necessidade do uso regular e contínuo do probiótico sendo necessário para obter o efeito antifúngico pretendido. Entretanto outros estudos devem ser realizados para determinar dose ideal na busca de um valor médio que possa servir na maioria dos casos.

O uso do probiótico pode controlar os casos de infecção vaginal por *Candida* sp. e reduzir significativamente o uso de antifúngicos convencionais, contribuindo para a diminuição de casos de resistência aos medicamentos. O leite fermentado pode ter esta atividade protetora, mas depende de uma ação direta da bactéria sobre a área afetada e sua aplicação é desconfortável, visto que não é produzido com esta finalidade, mas tem preço baixo e, portanto, mais acessível para a maioria da população. De qualquer modo,

este é um experimento que sugere a possibilidade de controle de candidíase de repetição com probióticos, e outros estudos devem ser realizados para normatizar o uso, bem como desenvolver novas formas de preparação do micro-organismo protetor, como por exemplo, cremes vaginais ou óvulos.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Dos dados obtidos no questionário, 33% das mulheres revelaram episódios de Candidíase vaginal, sendo 50% dos casos de repetição.
- A prevalência da infecção nas diferentes faixas etárias pode ser justificada pelo hiper-estrogenismo devido ao uso de contraceptivos orais e o uso de antifúngicos, muitas vezes por longo período sem um critério e indicação.
- Lactobacilos acidificam o meio proporcionando um ambiente com potencial efeito protetor contra micro-organismos.
- Lactobacilos podem prevenir o crescimento micelial da levedura quando em grandes concentrações, uso regular e contínuo.
- Tanto o probiótico liofilizado como o leite fermentado tipo *Yakult*® conseguiu inibir o crescimento das leveduras *in vitro*, principalmente nas maiores concentrações, nos tempos de 24 e 48 horas.

REFERÊNCIAS

- ÁLVAREZ, C.A.; SVIDZINSKI, T.I.E. & CONSOLARO, M.E.L. Candidíase Vulvogainal: Fatores Predisponentes do Hospedeiro e Virulência das Leveduras. **J Bras Patol Med Lab.**, v. 43, n. 5, p. 319-27, 2007.
- ANDRIOLI, J. L. et al. Frequência de leveduras em fluido vaginal de mulheres com e sem suspeita clínica de candidíase vulvovaginal. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 31, n. 6, p. 300-304, 2009.
- BAGG, J.; JACKSON, M.S.; SWEENEY, M.P.; RAMAGE, G. & DAVIES, A.N. Susceptibility to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) Oil of Yeast Isolated from the Mouths of Patients with Advanced Cancer. **Oral Oncology**. 42: 487-492. 2005.
- BARBEDO LS, Sgarbi DBG. Candidíase. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, Rio de Janeiro. 2010; 22(1):22-38.
- BASTOS AMC, Bravo RS, Goulart Filho RA, Isalan TB, Barreto NA. Perfil das Mulheres com processo inflamatório por *Candida* em resultados de colpocitologia oncológica numa clínica de DST. **DST J Bras Doenças Sex Transm**. 2003; 15(2):26-38.
- BENTO, J. **Mulher & Saúde**. São Paulo: Alaúde Editorial, 2004.
- BOATTO, H. F. et al. 2007. Correlação entre os resultados laboratoriais e os sinais e sintomas clínicos das pacientes com candidíase vulvovaginal e relevância dos parceiros sexuais na manutenção da infecção em São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. Vol.29. Rio de Janeiro, p.80-84.
- 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.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias**: guia de bolso. 8. ed. Brasília: Editora MS, 2010.
- CHAFFIN, W.L. et al. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. **Microbiol Molec Biol Rev**, v. 62, p. 130-80, 1998.
- CHEN, C. C., WALKER W. A. **Probiotics and prebiotics**: role in clinical disease states. *Adv. Pediatr.* 2005; 52:77-113.
- COLOMBO, A.L. & GUIMARÃES, T. *Epidemiologia das Infecções Hematogênicas por Candida spp.* **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 36(5): 599-607. 2003.

- COURET, V. et al. Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. **International Journal of Food Microbiology**, 2004.
- DENNERSTEIN, G. Pathogenesis and treatment of genital candidiasis. **Aust Fax Psysician**; 1996. 1998; 27: 363-69.
- DENNERSTEIN, G. J.; ELLIS, D. H. Oestrogen, glycogen and vaginal candidiasis. **Australian and New Zeland Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 41, n. 3, p. 326-328, 2001.
- FERNANDES, C.E.; MACHADO, R.B. Aspectos etiopatogênicos, diagnósticos e terapêuticos da candidíase vulvovaginal. **Revista Bras Med**, v. 7, p. 100-4, 1996.
- FERRAZZA, 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*. **Rev Bras Ginecol Obstet**. 27(2): 58-63. 2005.
- FEUERSCHUETTE, O. H. M. et al. Candidíase vaginal recorrente: manejo clínico. **FEMINA**, v. 38, n. 2, p. 31-36, fev. 2010.
- FIDEL PL, Vazquez JA, Sobel JD. Candida glabrata: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. **Clin Microbiol Rev** 1999; 12(1): 80-96.
- GONÇALVES, A.K.S. Mecanismos de defesa vaginal. In: Martins NV, Ribalta JCL (eds). **Patologia do trato genital inferior: diagnóstico e tratamento**. São Paulo: Roca; 2005. p. 107-221.
- GONZÁLEZ et al. *Patient Preferences and Treatment Safety for Uncomplicated Vulvovaginal Candidiasis in Primary Health Care*. **BMC Public Health**. 11:63. 2011.
- GIRALDO, P. C. et al. **O frequente desafio do entendimento e do manuseio da vaginose bacteriana**. Campinas, 2007.
- HASENACK, B. S.; MIQUELÃO, A. K. B.; MARQUEZ, A. S.; TRAPP E PINHEIRO, E. H. T.; URNAU, A. P.; SOARES, F. F.; SIQUEIRA, M. P.; DINIZ, R. S. Vaginose bacteriana em mulheres carentes menopausadas e não menopausadas. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Tijuca, RJ, v. 38, n. 42. p. 239-242, 2006.
- HAVENAAR, R.; HUIS IN'T VELD, M. J.H. **Probiotics**: a general view. In: WOOD, B.J.B. Lactic acid bacteria in health and disease 1. Amsterdam: Elsevier Applied Science, 1992. p.151-170.
- HORI, T. et al. Effect of intranasal administration of Lactobacillus casei Shirota on Influenza virus infection of upper respiratory tract in mice. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, New York, v.8, n.3, p.593-597, 2001.
- KURTZMANN, C. P.; FELL, J. W. **The Yeast: a taxonomic study**. 4th ed. Amsterdam: Elsevier, 1998.

KAUFFMAN, C.A; FISHER, J.F; SOBEL; LD; NEWMAN, C.A. Candida Urinary Tract Infections Diagnosis. **Clinical Infectious Diseases**, Michigan, v. 52, n.6, p. 452-456, 2011.

LACAZ, C. S. et al. **Guia para identificação: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. São Paulo: Sarvier, 1998. 445p.

LEVINSON, W; JAWETZ, E. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 4. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1998.

LIANOS R, Fernandez-Espinar MT, Querol A. **A comparison of clinical and food *Saccharomyces cerevisiae* isolates on the basis of potential virulence factors**. Antoine Van Leuwenhoek 90: 221-231, 2006.

LINARES, C.E.B.; DAGIOS, G. CARATI, M.R.; GASPARIN, M.P.; NETO, A.T.; SCHEID, L.A. & SCHUBERT, A. **Estudo Epidemiológico e Perfil da Suscetibilidade de Amostras de Candida Isoladas de Mulheres com Candidíase Vulvovaginal em Frederico Westphalen – RS**. Saúde. 31(1-2): 42-46. 2005.

MACIEL, G. P. et al. Aspectos clínicos, patogênese e diagnóstico de *Trichomonas vaginalis*. **Bras Patol Med Lab**. v. 40. n. 3. p. 152-60. Junho 2004.

MADHAVAN, P.; JAMAL, F. & CHONG, P.P. **Laboratory Isolation and Identification of Candida Species**. **Journal of Applied Sciences**. 11(16): 2870-2877. 2011.

MARCO, M. L. et al. Towards understanding molecular modes of probiotic action. **Current Opinion in Biotechnology**, 2006.

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

MARRAZZO, J.M. Vulvovaginal candidiasis: over the counter doesn't seem to lead to resistance. **BMJ**, v. 326, p. 993-94, 2003.

MARIE, C. & WHITE, T.C. **Genetic Basis of Antifungal Drug Resistance**. **Current Fungal Infection Reports**. 3:163-169. 2009.

MADHAVAN, P.; JAMAL, F. & CHONG, P.P. **Laboratory Isolation and Identification of Candida Species**. **Journal of Applied Sciences**. 11(16): 2870-2877. 2011.

MENDES, C. L et al. 2005 Prevalência de Cândida sp. em infecções vaginais. **Revista NewsLab**, 68ª ed., p.104-112.

NARDIN, M.E. et al. Prevalencia de la candidiasis vulvovaginal y su relación con algunos factores de riesgo. **Revista Argent Microbiol**, 2000.

PATEL, D.A. et al. Risk factors for recurrent vulvovaginal candidiasis in women receiving maintenance antifungal therapy: results of a prospective cohort study. **Am J Obst Gyn**, v. 190, p. 644-53, 2004.

- PERDIGÓN, G.; ALVAREZ, S. Probiotics and the immune state. In: FULLER, R. **Probiotics: the scientific basis**. London: Chapman e Hall, 1992. p.145-180.
- PORTO, E. (Col.). **Candidiase**: Micologia do gênero *Candida*. Caracteres gerais e bases para sua classificação. São Paulo: Editora Pedagógica e Universitária Ltda., 1980.
- RIBEIRO, A.A.; OLIVEIRA, D. F.; SAMPAIO, M. C. N.; CARNEIRO, M. A. S.; TAVARES, S. B. N.; SOUZA, N. L. A.; FONSECHI-CARVASAN, G. A.; ALCANFOR, J. D. A.; SANTOS, S.H.R. Agentes microbiológicos em exames citopatológicos: estudo de prevalência. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Goiás, v.39, n. 3. p. 179-181, 2007.
- RIBEIRO, E.L.; GUIMARÃES, R.I.; INÁCIO, M.C.C.; FERREIRA, W.M.; CARDOSO, C.G.; DIAS, S.M.S. & NAVES, P.L.F. Aspectos das Leveduras de *Cândida* Vinculadas as Infecções Nosocomiais. **NewsLab**. Edição 64. 2004.
- ROSA, M. I.; RUMEL D.. Fatores associados à candidíase vulvovaginal: estudo exploratório. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** 2004, vol.26, n.1, pp. 65-70.
- SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- SOONG, D. & EINARSON, A. Vaginal Yeast Infection during Pregnancy. **Canadian Family Physician**. 55. 2009.
- SOBEL, J.D; FARO, S; FORCE, R.W; FOXMAN, B; LEDGER W.J; NYIRJESY, P.R et al. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic and therapeutic considerations. **Am J Obstet Gynecol** 1998; 178: 203 – 11.
- TAMINE, Y. Fermented milks: a historical food with modern applications-a review. **European Journal of Clinical Nutrition**, 2002.
- ZIARRUSTA, G.B. Vulvovaginitis candidiásica. **Rev Iberoam Micol**, v. 19, p. 22-4, 2002.

APENDICE A- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

(Res. CONEP 196/96)

Título do Projeto: Frequência da candidíase vaginal e o uso de probióticos no controle da infecção.

Endereço/ telefone:

Pesquisador responsável: _____

Local: Bauru - SP

Eu, Profa Dra. Silvana Torossian Coradi, Residente na Rua professor Luis Braga 4-20 Cidade de Bauru, portador do R.G.17229558-0. entendo que qualquer informação obtida sobre mim será confidencial. Também entendo que meus registros de pesquisa estão disponíveis para revisão dos pesquisadores.

Esclareceram-me que minha identidade não será revelada em nenhuma publicação desta pesquisa; por conseguinte, consinto na publicação para propósitos científicos.

Riscos e Benefícios

Não haverá risco algum referente à participação na pesquisa e o estudo contribuirá para a descoberta de novos tratamentos em úlceras varicosas.

Custos e Pagamentos

Não terá custos e pagamentos associados à participação do sujeito de pesquisa neste estudo, assim como a sua participação não será remunerada.

Direito de Desistência

Entendo que estou livre para recusar minha participação neste estudo ou para desistir a qualquer momento e que a minha decisão não afetará adversamente meu tratamento na clínica ou causar perda de benefícios para os quais eu poderei ser indicado.

Consentimento Voluntário

Certifico que li ou foi-me lido o texto de consentimento e entendi seu conteúdo. Minha assinatura demonstra que concordei livremente em participar deste estudo.

Assinatura do participante da pesquisa: _____.

Data: _____.

Certifico que expliquei a (o) Sr.(ª), a natureza, o propósito, os benefícios e os possíveis riscos associados à sua participação nesta pesquisa; que respondi a todas as questões que me foram feitas e testemunhei assinatura acima.

Assinatura do Pesquisador Responsável: _____

Data: _____

APÊNDICE B- Frequência da candidíase vaginal e o uso de probióticos no controle da infecção

Responsáveis: **Heloisa Rodrigues da Silva, Vitória de Oliveira, Silvana Torossian Coradi**

QUESTIONÁRIO

Paciente nº _____

1. Idade: _____

2. Escolaridade:

- Ensino fundamental incompleto
- Ensino fundamental completo
- Ensino médio incompleto
- Ensino médio completo
- Curso técnico
- Ensino superior incompleto
- Ensino superior completo

3. Estado civil:

4. Gestante? SIM () NÃO ()

5. Tem filhos? SIM () NÃO ()

6. Faz o uso de contraceptivos orais? SIM () NÃO ()

7. Usa preservativo? SIM () NÃO ()

8. Tem diabetes? SIM () NÃO ()

9. Fez tratamento com antibióticos no ultimo ano? SIM () NÃO ()

10. Relata desconforto vaginal? (coceira, odor) SIM () NÃO () Se sim, o que?

11. Tem corrimento? SIM () NÃO ()

Branco Amarelado Cinza Esverdeado Não definido

12. Já teve candidíase?

- Sim, apenas uma vez
- Sim, mais de uma vez em um ano
- Sim, mais de três vezes em um ano
- Sim, mais de uma vez em período maior que um ano
- Nunca teve

13. Fez ou faz tratamento? SIM () NÃO (). Qual medicamento utiliza ou utilizou?

ANEXO A- Aprovação comitê de ética

UNIVERSIDADE DO SAGRADO
CORAÇÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Frequência da candidíase vaginal e o uso de probióticos no controle da infecção.

Pesquisador: Silvana Torossian Coradi

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 56379116.3.0000.5502

Instituição Proponente: Universidade do Sagrado Coração - Bauru - SP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.691.586

Apresentação do Projeto:

os documentos anexados permitem analisar a proposta

Objetivo da Pesquisa:

Determinar a frequência de colonização por leveduras do gênero *Candida* na mucosa vaginal, em mulheres de diferentes idades

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

benefícios e riscos inerentes ao método a que o pesquisador pretende. Ambos parecem enigmáticos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

o texto é fluido, mas necessita de um ordenamento lógico para melhor entendimento, ainda que uma leitura cuidadosa permita inferir as pretensões do estudo, assim como o método pretendido

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE apresenta sucintamente os elementos descritivos do estudo.

Recomendações:

sem recomendações

Endereço: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pos-Graduação

Bairro: Rua Irmã Arminda Nº 10-50

CEP: 17.011-160

UF: SP

Município: BAURU

Telefone: (14)2107-7051

E-mail: comitedeeticadehumanos@usc.br

**UNIVERSIDADE DO SAGRADO
CORAÇÃO**



Continuação do Parecer: 1.691.586

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

pode ser aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_714263.pdf	19/08/2016 09:37:34		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.docx	19/08/2016 09:36:49	Silvana Torossian Coradi	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Brochura.docx	23/05/2016 18:12:57	Silvana Torossian Coradi	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Questionario.docx	23/05/2016 18:08:30	Silvana Torossian Coradi	Aceito
Orçamento	Orcamento.doc	23/05/2016 18:07:52	Silvana Torossian Coradi	Aceito
Cronograma	cronograma.doc	23/05/2016 18:06:01	Silvana Torossian Coradi	Aceito
Folha de Rosto	folha.pdf	23/05/2016 17:58:24	Silvana Torossian Coradi	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BAURU, 23 de Agosto de 2016

Assinado por:
Marcos da Cunha Lopes Virmond
(Coordenador)

Endereço: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pos-Graduação	
Bairro: Rua Irmã Arminda Nº 10-50	CEP: 17.011-160
UF: SP	Município: BAURU
Telefone: (14)2107-7051	E-mail: comitedeeticadehumanos@usc.br