



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

JOSÉ MARCOS SANCHES JÚNIOR

**ANÁLISE LIPIDÔMICA DO CONTEÚDO VAGINAL DE MULHERES COM
CANDIDÍASE VULVOVAGINAL E VAGINOSE CITOLÍTICA**

***LIPIDOMICS ANALYSIS OF THE VAGINAL DISCHARGE IN WOMEN WITH
VULVOVAGINAL CANDIDIASIS AND CYTOLYTIC VAGINOSIS***

CAMPINAS
2017

JOSÉ MARCOS SANCHES JÚNIOR

**ANÁLISE LIPIDÔMICA DO CONTEÚDO VAGINAL DE MULHERES COM
CANDIDÍASE VULVOVAGINAL E VAGINOSE CITOLÍTICA**

***LIPIDOMICS ANALYSIS OF THE VAGINAL DISCHARGE IN WOMEN WITH
VULVOVAGINAL CANDIDIASIS AND CYTOLYTIC VAGINOSIS***

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas – UNICAMP para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, área de concentração em Fisiopatologia Ginecológica.

Dissertation submitted to Gynecology and Obstetrics Post-Graduation Program of the Medical Science School of the University of Campinas for obtaining the title of Master of Health Sciences, specialization in Gynecological Pathophysiology.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Paulo César Giraldo

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO JOSÉ MARCOS SANCHES JUNIOR E ORIENTADA PELO PROF. DR. PAULO CÉSAR GIRALDO

CAMPINAS
2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2016/18850-9

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

Sanches Junior, José Marcos, 1988-
Sa55a Análise lipídômica do conteúdo vaginal de mulheres com candidíase vulvovaginal e vaginose citolítica / José Marcos Sanches Junior. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Paulo César Giraldo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Descarga vaginal. 2. Candidíase vulvovaginal. 3. Disbiose. 4. Lipídeos. 5. Espectrometria de massas. I. Giraldo, Paulo César, 1956-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Lipidomics analysis of the vaginal discharge in women with vulvovaginal candidiasis and cytolytic vaginosis

Palavras-chave em inglês:

Vaginal discharge

Candidiasis, Vulvovaginal

Dysbiosis

Lipids

Mass spectrometry

Área de concentração: Fisiopatologia Ginecológica

Titulação: Mestre em Ciências da Saúde

Banca examinadora:

Paulo César Giraldo [Orientador]

Cristina Laguna Benetti Pinto

Iara Moreno Linhares

Data de defesa: 30-11-2017

Programa de Pós-Graduação: Tocoginecologia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

JOSÉ MARCOS SANCHES JUNIOR

ORIENTADOR: Prof. Dr. Paulo César Giraldo

MEMBROS:

- 1. PROF. DR. PAULO CÉSAR GIRALDO**
 - 2. PROF. DRA. CRISTINA LAGUNA BENETTI PINTO**
 - 3. PROF. DRA. IARA MORENO LINHARES**
-

**Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas**

**A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca
examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.**

Data: 30/11/2017

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho...

Ao meu falecido pai, José Marcos Sanches (Zequinha), por ter sido um exemplo de pai, professor e amigo. Dedico este trabalho ao homem que construiu sua vida baseado na honestidade e no respeito, e mesmo em momentos de dificuldade sempre com o sorriso no rosto. Dedico este trabalho ao homem que sua missão foi trazer alegria a todos a sua volta. Dedico este trabalho ao homem que trabalhou incansavelmente durante toda sua vida... buscando sempre melhores condições de vida para si e sua família. Este homem que me ensinou que temos que buscar o crescimento pessoal, não apenas para benefício próprio mas também para o evolução de outros... Por mais que tenhamos passado pouco tempos juntos, Pai, dedico este trabalho ao Senhor que foi e sempre será um exemplo do homem que me tornei e quero ser.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela força e dedicação, coragem para vencer qualquer obstáculo e ter determinação para alcançar meus objetivos. Agradeço a Ele que me proporciona a garra de viver cada dia com a alegria de ter um dia melhor que o outro e a luz recebida todos os dias.

Às pacientes deste estudo, por confiarem em mim e pelo aceite em participar desde estudo.

Ao Prof. Dr. Paulo César Giraldo, pela disponibilidade, paciência e cuidado. Agradeço ao senhor que pôde me mostrar a importância da pesquisa para a promoção da saúde da mulher. Obrigado pelas inúmeras oportunidades e confiança ao longo deste período incrível que tive a oportunidade estar ao lado de um grande líder e mestre, Dr. Paulo. Sou muito grato ao senhor por todos os ensinamentos que me permitiu construir, a partir de uma visão crítica, uma base sólida sobre como fazer pesquisa e ensinar.

À Dra. Rose Amaral, coordenadora do Ambulatório de Infecções Genitais Femininas do Caism/UNICAMP, pelos ensinamentos acerca das infecções e disbioses vaginais. Agradeço à Rose, uma mulher guerreira, exemplo como médica ginecologista, ótima professora e pesquisadora pela amizade que construímos durante este período em que trabalhamos juntos.

À Michelle Discacciati, pelos ensinamentos e amizade durante todo o mestrado. Agradeço pela visão sobre a pesquisa científica e paciência comigo. Obrigado pela parceria de sempre.

À equipe de enfermagem do Ambulatório de Infecções Genitais Femininas, pelo excelente trabalho e parceria. Em especial agradeço à Laine, Lais e Jussara pela atenção integral para que este estudo ocorresse e pela amizade de sempre.

Aos residentes que colaboraram com as coletas durante todo o estudo, em especial à Thalita, Bianca, Tamyse, Nélio, Raquel, Rafael e Marcelo.

Aos coordenadores e equipe dos laboratórios do Caism que viabilizaram o espaço para o preparo das amostras deste estudo e toda ajuda necessária ao longo do projeto. Obrigado Juliana Muçouçah e Fernando Guimarães.

Ao Laboratório Thomson Mass Spectrometry pela colaboração neste estudo. Agradeço pela parceria realizada entre o Ambulatório de Infecções Genitais Femininas e o laboratório a qual foi possível a realização e conclusão deste estudo. Em especial agradeço ao Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin por abrir as portas de seu laboratório e confiar plenamente na importância deste estudo. Agradeço à equipe envolvida neste trabalho: Lygia, Gustavo, Fernanda e Marcel.

Aos professores que aceitaram compor a banca examinadora da defesa de mestrado. Em especial, à Dra. Cristina Laguna e Dra. Adriana Orcesi, pelas contribuições muito valiosas na qualificação deste mestrado.

Aos professores da Pós-graduação por todos os ensinamentos e dedicação nas aulas.

À Marcia e Bia, secretárias da Divisão de Ginecologia, pela competência em realizar suas funções e atenção integral a qualquer necessidade, especialmente à Marcia pelo carinho de sempre.

À Melissa e Denise (secretárias da Pós-graduação), Cris e Margareth (secretárias do Departamento de Tocoginecologia) e a todos àqueles que colaboraram de alguma forma com este trabalho.

Aos meus amigos Paulo, Augusto, Kézia, Day, Felipe, Mari, Isa e Gabriel, por me proporcionar um ambiente familiar aqui em Campinas e por acompanhar cada momento deste mestrado. Obrigado pessoal pelas conversas, risadas, parceria, respeito e amizade de sempre. Sou muito grato à Deus ter nos colocado juntos e nos permitir dividir conquistas e alegrias.

Aos meus amigos da pensão, que foram os que primeiro me acolheram em Campinas. Obrigado Thaynara, Juninho, Nilton e Denise pela amizade e companheirismo.

Aos meus melhores amigos André e Karolayne pela parceria incondicional, respeito e confiança. Obrigado meus amigos queridos por tudo.

Ao Tiago Utuari, que acompanhou todo o processo seletivo deste mestrado, viveu a alegria da aprovação e as conquistas iniciais desta fase. Obrigado pela parceria e ajuda neste período e por fazer parte desta conquista.

Aos meus amigos do curso de Ciências Biológicas pela torcida e vibração a cada conquista. Obrigado pelo carinho de sempre, pela confiança e o desejo de querermos o sucesso e felicidade para todos nós sempre e sempre. Sou muito feliz por manter uma amizade tão bonita por tanto tempo.

Aos amigos que fiz em Campinas e que permitiram tornar esta passagem mais leve e feliz. Obrigado Luiz, Léo e Guilherme. E também às amigas Tici, Etienne, Isabel, Marcela e Helena, as quais tive a oportunidade de trabalhar junto e dividir conhecimento, experiências e risadas.

Ao Vicente Fernandes, uma pessoa maravilhosa que tive a oportunidade de conhecer em Campinas e que pôde me fazer acreditar que as coisas iam dar certo no fim de tudo. Obrigado pela ajuda e parceria nesta fase final do meu mestrado.

Especialmente, agradeço imensamente as mulheres da minha vida: Mãe, Vó, minhas irmãs Fabiane e Fernanda, minhas sobrinhas lindas Maria Clara e Carolina. Sou muito grato por Deus ter colocado vocês na minha vida e me fazer ser a pessoa que sou hoje. De alguma forma todas vocês colaboraram para que eu chegasse até aqui e fico muito feliz em poder contar com cada uma de vez e da forma que cada uma pode ajudar, sempre com amor e dedicação.

A todos amigos e familiares que sempre confiaram e torceram pela minha felicidade e sucesso.

Agradecimento institucional:

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo custeio da minha bolsa de estudos para o mestrado no período de dezembro de 2016 à novembro de 2017 (projeto nº 2017/18850-9).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo custeio da minha bolsa de estudo para o mestrado no período de março de 2016 à novembro de 2016..

RESUMO

Introdução: A candidíase Vulvovaginal (CVV) e a vaginose citolítica (CV) são condições ginecológicas que frequentemente incluem prurido vaginal, queimação, descarga anormal, disúria e dispareunia. Embora os sintomas sejam semelhantes, o microambiente vaginal e a resposta inflamatória local são completamente diferentes, fato que implica em tratamentos diferentes. Os fatores desencadeadores e a fisiopatogenia de ambas as doenças não são claros. Os avanços nas técnicas de espectrometria de massa e bioinformática colaboram para o melhor entendimento dos processos de saúde e doença, tendo a lipidômica como ótima ferramenta para caracterizar potenciais biomarcadores para muitas doenças. **Objetivo:** Caracterizar os lipídios presentes no conteúdo vaginal de mulheres com CVV e VC, e relacioná-los com as doenças. **Materiais e métodos:** Estudo de corte transversal analisou o conteúdo vaginal de 24 mulheres não grávidas, de idade entre 18 e 44 anos, atendidas no Ambulatório de Infecções Genitais-CAISM-UNICAMP, sendo 8 com CVV, 8 com VC (com queixa de corrimento vaginal e prurido/queimação) e outras 8 mulheres sem vulvovaginites ou disbioses vaginais. Todas as mulheres assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, passaram por anamnese detalhada e a exame especular, quando foi colhido material vaginal para estudos citológico, microbiológico e lipidômico. As amostras da parede vaginal lateral foram coletadas com swab esteril de Dacron e dispostas em lâminas de vidro para coloração de Gram, em meio de cultura de Sabouraud para pesquisa de fungos e armazenadas em tubos Falcon secos a -80° Celsius para o estudo lipidômico por meio de espectrometria de massas (EM). O diagnóstico de Candidíase vaginal foi feito considerando a presença no conteúdo vaginal de hifas ou blastoconídeos nos esfregaços corados pelo Gram e pela positividade da cultura específica. A vaginose citolítica foi caracterizada pela ausência dos elementos micóticos e de processo inflamatório (leucócitos), presença de lise de células epiteliais no esfregaço vaginal. As amostras para avaliação do lipidoma foram ressuspensas em água desionizada seguido da adição de clorofórmio e metanol, agitadas e centrifugadas e sonicadas para lise do material e a seguir, secas no *SpeedVac*. A separação cromatográfica foi realizada em um sistema automatizado de cromatografia líquida de ultra-alta

eficiência Agilent1290-Infinity e acrescida de coluna C-18. Os dados foram obtidos no modo positivo e negativo, pelo software *MassHunter Qualitative* (Agilent). Todos os metabolitos foram avaliados por erro de massa (≤ 5 ppm), padrão isotópico, padrões de fragmentação e tempo de retenção plausível, caracterizados a partir das descrições dos compostos pelo The Human Metabolome Database, XCMS e Lipid Maps. Foram aplicadas técnicas de análise de dados multivariados para processar os dados encontrados. A segregação entre grupos foi analisada pela PCA (análise dos componentes principais) e PLS-DA (análise discriminante de mínimos quadrados parciais). **Resultados:** A análise PCA mostrou uma separação importante que caracterizou a diferença metabólica entre os três grupos, apontando um total de 38 lipídios pela análise de PLS-DA. Os principais potenciais biomarcadores que se relacionam com a fisiopatologia da CVV foram: 15-metil-15S-Prostaglandina D2, O-Adipoilcarnitina, fosfoserina, ácido undecanóico e formil dodecanoato. Na VC encontrou-se 1-(11Z-docosenoil)-glicero-3-fosfato e ácido 5-aminopentanóico, o ácido fosfatídico 1-oleoil-cíclico e o ácido palmitólico como biomarcadores. No grupo controle os principais lipídios encontrados foram ácido eicosadienóico, 1-estearoil-cíclico-fosfato, ácido mirístico, 7Z, 10Z-hexadecadienóico, e ácidos glicerolfosfatos. **Conclusão:** Mulheres com CVV e VC apresentam queixas clínicas semelhantes (prurido, ardor e corrimento vaginal), porém a composição lipídica é diferente para estas condições, sendo também diferente em mulheres sem queixas vaginais. Os potenciais biomarcadores lipídicos podem elucidar mecanismos fisiopatológicos da CVV e VC ainda não descritos, tais como fatores que levam adesão de moléculas ao epitélio vaginal, lise celular, crescimento lactobacilar, estresse oxidativo e apoptose, colaborando para o melhor entendimento destas condições.

Palavras-chave: *Descarga vaginal; candidíase vulvovaginal; disbiose; lipídeos; espectrometria de massas.*

ABSTRACT

Background: Vulvovaginal candidiasis (VVC) and cytolytic vaginosis (CV) are gynecological conditions that often include vaginal itching, burning, abnormal discharge, dysuria and dyspareunia. Although the symptoms are similar, the vaginal microenvironment and the local inflammatory response are completely different, a fact that implies in different treatments. The triggering factors and pathophysiology of both diseases are unclear. Advances in mass spectrometry and bioinformatics techniques contribute to a better understanding of the health and disease processes, having the lipidomics as a great tool to characterize potential biomarkers for many diseases. **Objective:** Characterize the lipids in the vaginal contents in women with VVC and CV, and relate them to these diseases. **Materials and methods:** Cross-sectional study analyzed the vaginal contents of 24 non-pregnant women, aged between 18 and 44 years, attended at the Genital Infections Outpatient Clinic (CAISM-UNICAMP), 8 with CVV, 8 with CV (vaginal discharge and pruritus/burning) and another 8 women without any vulvovaginal complaint. All the women signed the free and informed consent term, underwent detailed anamnesis and specular examination, when vaginal material was collected for cytological, microbiological and lipid studies. Samples of the lateral vaginal wall were collected with sterile Dacron swab and put on glass slides for Gram staining, in Sabouraud culture for fungal screening and stored in Falcon dry tubes at -80 ° C for the lipidomics analysis by mass spectrometry (MS). The diagnosis of vaginal candidiasis was made considering the presence in the vaginal contents of hyphae or blastocodides in the smears stained by Gram and the positivity of the specific fungal culture. Cytolytic vaginosis was characterized by the absence of mycotic elements and inflammatory process (leukocytes), presence of epithelial cells lysis in the vaginal smear. The lipidomics samples were resuspended in deionized water followed by the addition of chloroform and methanol, shaken and centrifuged and sonicated for lysis of the material, and then dried on SpeedVac. Chromatographic separation was performed on an Agilent1290-Infinity automated ultra-high performance liquid chromatography system plus a C-18 column. The data were obtained in positive and negative mode by MassHunter Qualitative software (Agilent). All metabolites were assessed by mass

error (≤ 5 ppm), isotope standard, fragmentation patterns and plausible retention time, characterized from the descriptions of the compounds by The Human Metabolome Database, XCMS and Lipid Maps. Multivariate data analysis techniques were used to process the data found. Segregation between groups was analyzed by PCA (main component analysis) and PLS-DA (discriminate partial least squares analysis). **Results:** The PCA analysis showed an important separation that characterized the metabolic difference between the three groups, identifying a total of 38 lipids by the PLS-DA analysis. The major biomarkers that correlate with the pathophysiology of CVV were: 15-methyl-15S-Prostaglandin D2, O-adipoylcarnitine, fosfoserine, undecanoic acid and formyl dodecanoate. In VC there were 1- (11Z-docosenoyl)-glycerol-3-phosphate and 5-aminopentanoic acid, 1-oleoyl cyclic phosphatidic acid and palmitolic acid as biomarkers. In the control group, the main lipids found were eicosadienoic acid, 1-stearoyl cyclic phosphate, myristic acid, 7Z, 10Z-hexadecadienoic acid, and glycerol phosphate acids. **Conclusion:** Women with CVV and VC present similar clinical complaints (pruritus, burning and vaginal discharge), but the lipid composition is different for these conditions, being also different in women without vaginal complaints. Lipid potential biomarkers can elucidate physiopathological mechanisms of CVV and VC not yet described, such as factors that lead to adhesion of molecules to the vaginal epithelium, cell lysis, lactobacillary growth, oxidative stress and apoptosis, collaborating to better understand these conditions.

Keywords: *Vaginal discharge; vulvovaginal candidiasis; dysbiosis; lipids; mass spectrometry.*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	35
2.1 Objetivo geral	35
2.2 Objetivos específicos	35
3. METODOLOGIA	36
3.1 Seleção dos sujeitos	36
3.2 Identificação e classificação de candidíase vulvovaginal e vaginose citolítica	37
3.3 Análise lipidômica do conteúdo vaginal	38
3.4 Aquisição dos dados	38
3.5 Espectrometria de massas	39
3.6 Processamento dos dados	39
3.7 Análise estatística dos dados clínicos e sócio demográficos	40
4. RESULTADOS	41
5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÕES	72
7. REFERÊNCIAS	74
8. ANEXOS	83
8.1 - Anexo I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	85
8.2 - Anexo II – Instrumento para coleta de dados	90
8.3 - Anexo III – Instrumento para coleta de dados – Laudo bacterioscópico para determinação e conclusão do esfregaço	92
8.4 - Anexo IV – Biorrepositório	93
8.5 - Anexo V - Parecer consubstanciado do projeto de pesquisa analisado pela Comissão de Pesquisa CAISM/UNICAMP	95
8.6 - Anexo VI - Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp – Campus Campinas	97

1. INTRODUÇÃO

Nos dias atuais onde a biotecnologia emprega um papel importante no diagnóstico e tratamento de inúmeras doenças, muito métodos vêm sendo utilizados para melhor compreender os processos de fisiopatologia das doenças. As disbioses do trato genital inferior feminino além de muito frequentes durante o período do menacme, causando desconfortos genitais, estão associadas a maior probabilidade de aquisição de doenças como HIV, HPV e DIP (1-3).

A composição da microbiota vaginal é fundamental para a manutenção deste ambiente, possibilitando a primeira linha de defesa contra microrganismos agressores do epitélio vaginal (4). A instabilidade do ecossistema vaginal é um fator bastante conhecido pela clínica ginecológica e sua variação pode ser decorrente de diversos fatores, sejam eles fisiológicos (internos) ou externos. A microbiota vaginal é formada por diversos microrganismos que promovem um equilíbrio do microambiente local, sendo este mantido por complexas interações entre a microbiota normal, os produtos metabólicos microbianos, o estado hormonal e a resposta imune do hospedeiro (5).

A microbiota vaginal de mulheres em idade reprodutiva e em condições normais é composta por lactobacilos, que através de seu metabolismo acidificam o meio vaginal, favorecendo um ambiente hostil para instalação de agentes patogênicos. Os lactobacilos presentes na vagina desempenham um papel fundamental para a proteção vaginal através de diferentes mecanismos, tais como a produção de uma variedade de compostos que atuam como bactericidas, coagregação, exclusão competitiva e imunomodulação (6, 7).

As espécies mais prevalentes em mulheres saudáveis, isoladas em meio de cultura seletivas e identificadas por métodos moleculares, são *L. crispatus* (30,1%), *L. jensenii* (26,5%), *L. gasseri* (22,9%) e *L. vaginalis* (8,4%). Além de mais prevalentes, as espécies *L. crispatus*, *L. jensenii* e *L. gasseri* foram as que atingiram, em média, menores valores de pH (próximos a 4,0) e apresentaram melhor produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), características sugeridas como importantes para proteção contra várias infecções e disbioses,

principalmente a vaginose bacteriana (VB) (8). Contudo, a ausência ou o supercrescimento destes lactobacilos pode acarretar na instalação de patógenos e causar possíveis disbioses no ambiente vaginal (9, 10).

As observações atuais nos faz supor que a colonização da mucosa vaginal pelos lactobacilos durante o período da menacme é fator primordial para a manutenção da homeostase do ecossistema vulvovaginal. Os excessos (para menos e para mais) observados na colonização dos lactobacilos podem resultar em doenças e prejudicar a vida social e reprodutiva das mulheres acometidas. Considera-se nos dias atuais que a ausência ou diminuição acentuada dos lactobacilos dá oportunidade ao desenvolvimento de bactérias anaeróbicas associadas à VB e que são responsáveis pelos sinais e sintomas da (corrimento branco acinzentado e mau cheiro) da VB. Apesar da frequente presença da *Gardnerella vaginalis*, entende-se atualmente que não é ela por si só, a causadora da VB. Por outro lado, a vaginose citolítica (VC), doença associada ao excesso de proliferação dos lactobacilos, manifesta sinais e sintomas semelhantes aos da CVV, sem haver entretanto, qualquer indução do processo inflamatório local, em contraponto com a CVV. Parece, portanto que o crescimento exagerado de lactobacilos implicaria no desenvolvimento da VC, ao passo que a ausência de sua proliferação se associaria à VB. Na VB, o crescimento exagerado de bactérias anaeróbicas determinará a produção de substâncias (proteases, lipases e metaloproteinases) que induzirão a degradação da matriz extracelular dos tecidos e conseqüentemente, à facilitação de infecções mais graves (11, 12).

Duas doenças vulvovaginais que acometem um número muito grande de mulheres são a CVV e a VC. Ambas apresentam sintomatologia semelhantes e são confundidas frequentemente, resultando em erros diagnósticos e conseqüentes tratamentos inadequados (13). A CVV se apresenta com corrimento vaginal branco flocular que vem acompanhado de prurido vulvovaginal e eventualmente, dor e fissuras vulvares. O intenso processo inflamatório observado em vulva e/ou na vaginal se deve a agressão do epitélio causado por fungos, quase sempre a *Candida albicans* (14). Por outro lado, na VC não há infecção, mas sim uma disbiose que cursa com um excesso de proliferação dos lactobacilos e onde ocorre uma acentuada da lise celular, liberação de histamina e conseqüente descamação epitelial vaginal. A

queimação vaginal que se acentua no período pré-menstrual mimetiza a candidíase vulvovaginal (CVV), mas não é acompanhado de inflamação (13, 15, 16).

Todas estas alterações do epitélio vaginal determinarão a produção de diferentes ácidos orgânicos entre outras substâncias ou serão induzidos por elas. Em condições normais, conteúdo vaginal de mulheres sem infecções cervicovaginais contém seguramente diferentes ácidos orgânicos que influenciarão na manutenção do pH vaginal baixo afim de inibir o crescimento bacteriano anaeróbico e assim induzir uma resposta imune vaginal por ativação da via Th17 dos linfócitos (17-19).

Depois da VB, a CVV é considerada a vaginite mais comum entre as mulheres (20). É estimado que aproximadamente 10-15% de mulheres assintomáticas são colonizadas por *Candida*, 70-75% das mulheres apresentam pelo menos um episódio de CVV durante a vida, 50% podem sofrer um segundo episódio de CVV e 5-10% desenvolvem CVV recorrentes (14). Dentre os casos de CVV, *C. albicans* é a espécie mais comum identificada entre as mulheres, seguida da *C. Glabrata*. A CVV manifesta-se como um processo inflamatório, que, dependendo do grau de inflamação local, a sintomatologia pode ser maior ou menor. Os sintomas mais comuns para CVV são descarga vaginal de característica grumosa, de cor branca e aderida à parede vaginal, prurido, ardor vulvovaginal, dispareunia e disúria (21).

A patogenicidade da *Candida* está relacionada a fatores de virulência que incluem adesões, formação de biofilme, produção de enzima hidrolítica extracelular, formação e crescimento fúngico e comutação fenotípica (21, 22). A formação do biofilme é um fator de virulência bastante importante para *Candida* sp., relacionando aos processos de resistências antifúngicos, mecanismos de defesa do hospedeiro e ao estresse físico e químico (23). Como forma de proteção, as próprias células epiteliais da mucosa vaginal formam uma barreira contra a *Candida*, podendo até inibir o crescimento do fungo (24).

Por meio da secreção de enzimas hidrolíticas a partir das espécies de *Candida* ocorre adesão do fungo à mucosa vaginal, penetração, invasão e destruição de tecidos do hospedeiro (25). A enzima mais frequente nos

processos de patogenicidade da *Candida* é a aspartil proteinase (Saps), porém fosfolipases, lipases e hemolisinas também estão relacionadas aos fatores de virulência na candidíase (26). As lipases estão envolvidas na hidrólise de triacilgliceróis, tendo sua atividade associada à adesão da *Candida* ao epitélio, danos nos tecidos do hospedeiro e às células imunes (27).

A espécie *C. albicans* pode se apresentar dimorficamente e em circunstâncias normais, fazer parte da microbiota humana como um microorganismo comensal na superfície da mucosa. Para que a *Candida* seja comensal é necessário que haja um equilíbrio entre a microbiota, tecidos epiteliais e o sistema imunológico do organismo. Porém, perturbações fisiológicas e/ou externas podem resultar no crescimento descontrolado de *C. albicans*, acarretando em invasão de mucosa e até mesmo disseminação para outros órgãos, isso devido aos seus fatores de virulência que permitem que a *Candida* se adapte, invada e cause danos ao tecido, causar alterações de pH, osmolaridade e na resposta imune (28-30). O dimorfismo da *Candida* e suas relações com os fatores de virulência da *C. albicans* são bastante discutidos e investigados devido à necessidade de melhores entendimentos sobre estes fatores e a fisiopatologia da candidíase. Tanto a forma de levedura (figura 1.) como de hifa (figura 2.) parecem ser importantes para a virulência das espécies de *Candida* e possuem funções distintas durante os estágios da doença (31).

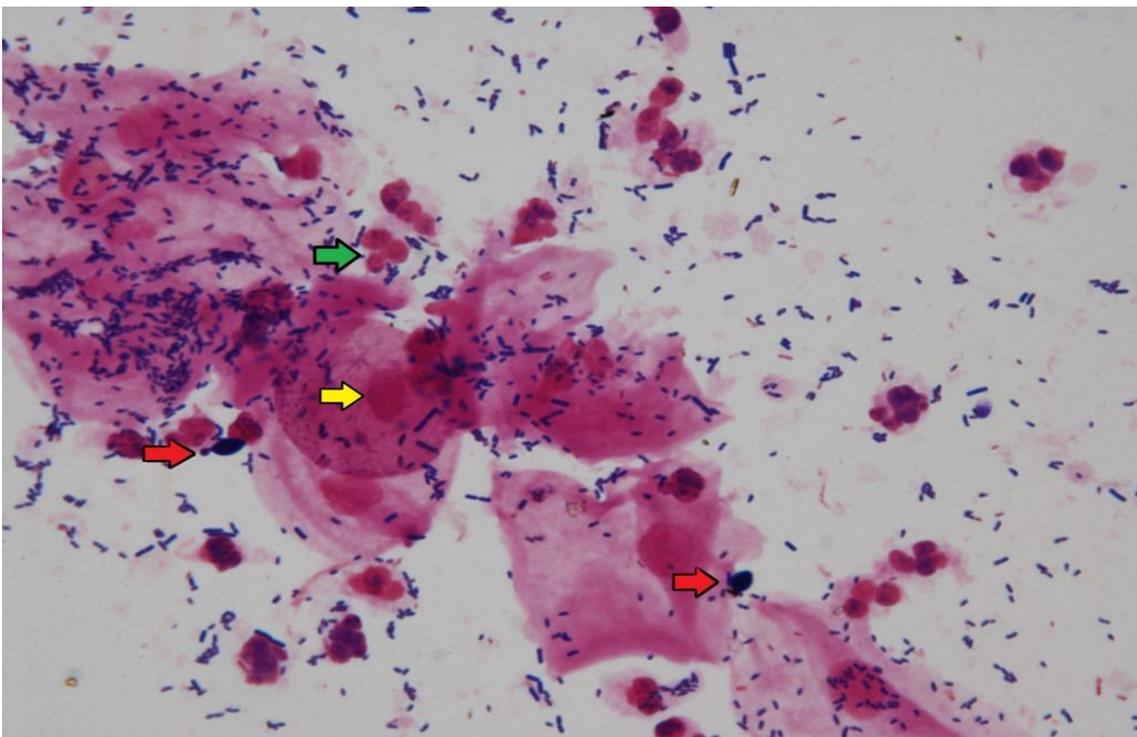


Figura 1. Imagem de bacterioscopia vaginal. Candidíase vulvovaginal: Flora do tipo I, predominância de células epiteliais intermediárias (seta amarela), processo inflamatório (seta verde) e presença de blastospóros de *Candida* (seta vermelha). Imagem capturada no Ambulatório de Infecções Genitais – CAISM/UNICAMP. Aumento de 1000x. Com imersão.

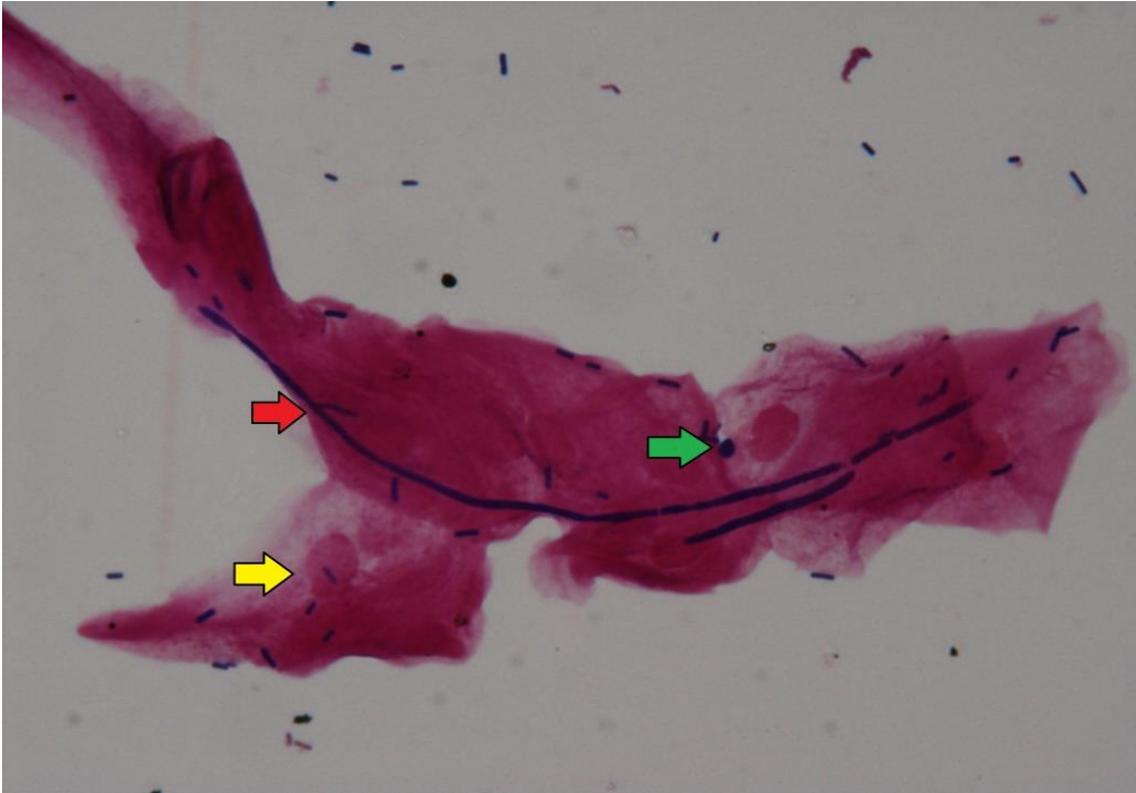


Figura 2. Imagem de bacterioscopia vaginal. Candidíase vulvovaginal: Flora do tipo I, predominância de células epiteliais intermediárias (seta amarela), presença de hifas (seta vermelha) e blastospóros de *Candida* (seta verde). Imagem capturada no Ambulatório de Infecções Genitais – CAISM/UNICAMP. Aumento de 1000x com imersão.

A VC é muito comum em mulheres em idade reprodutiva, sendo caracterizada pelo crescimento excessivo de lactobacilos devido a razões ainda desconhecidas. Mediante ao crescimento exacerbado de lactobacilos no ambiente vaginal ocorre uma diminuição do pH, dano do epitélio vaginal expresso pela lise celular (citólise), levando a sintomas clínicos como queimação, dor, prurido, dispareunia e corrimento abundante em muitos casos (10). Pacientes com VC apresentam um pH que pode variar de 3,5 a 4,5, se comparados à VB que possui pH superior a 4,5. Todos os resultados de VC são negativos para cultura específica de fungos (15). Uma vez que os sintomas da VC são muito semelhantes ao da CVV, é muito comum que na prática ginecológica possam ocorrer erros no diagnóstico e consequentemente oferecer um tratamento inadequado para a paciente, sendo fundamental para a prática em ginecologia o exame bacterioscópico (Figuras 1,2 e 3), cultura para

fungos, podendo eliminar a possibilidade de candidíase e evitar quadros recorrentes e/ou agudos de VC.

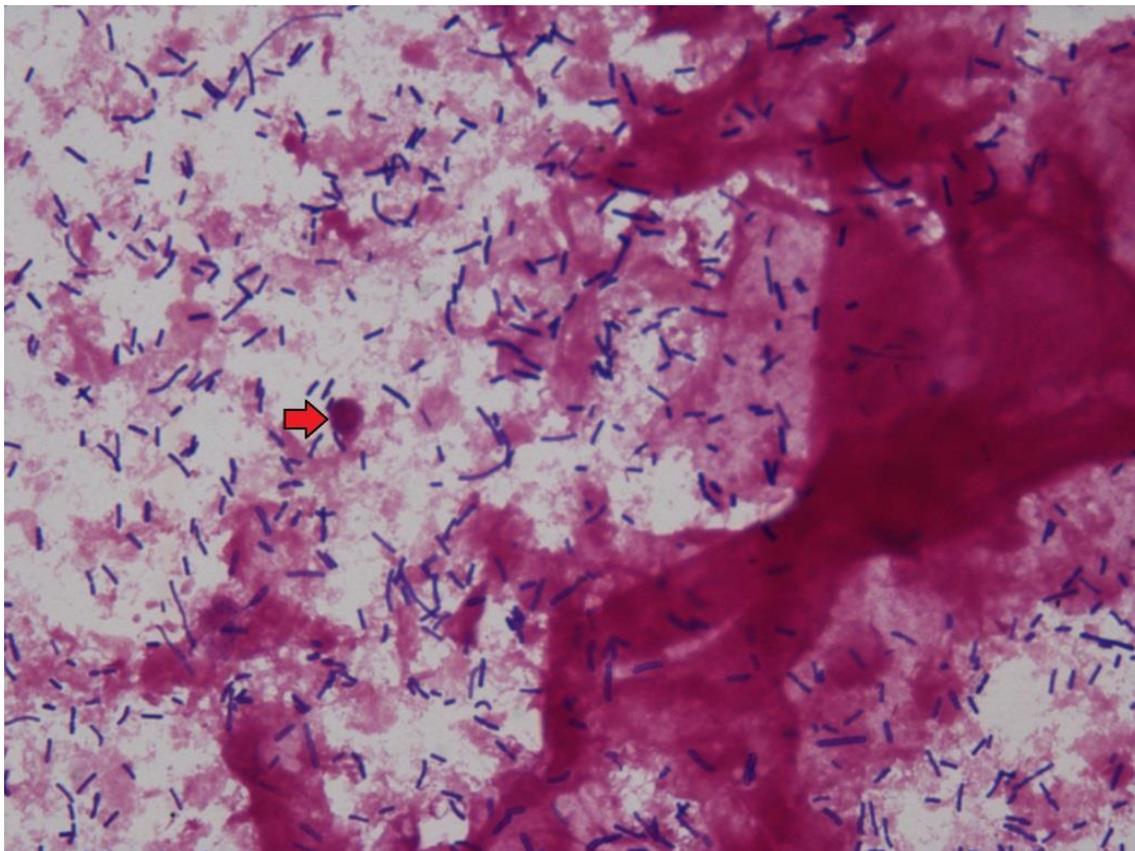


Figura 3. Imagem de bacterioscopia vaginal. Vaginose citolítica: Flora do tipo I com lactobacilos em grande quantidade, lise celular intensa das células epiteliais e visualização de núcleos nus (seta vermelha).m Imagem capturada no Ambulatório de Infecções Genitais – CAISM/UNICAMP. Aumento 1000x com imersão.

Hu e colaboradores caracterizaram a VC, por meio de coloração de Gram os esfregaços vaginais, exibindo grande quantidade de lactobacilos, ausência ou poucos leucócitos, ausência de *Trichomonas vaginalis*, fungos ou qualquer outro patógeno. Estas amostras mostraram evidências de lise celular do epitélio vaginal, incluindo fragmentações citoplasmáticas, visualização de núcleos nus e até mesmo “falsas *clue cells*” (epitélio fragmentado coberto por lactobacilos em grande quantidade) (figura 3.). Para CVV, incluíram a presença ou ausência de lactobacilos, células epiteliais normais, presença de leucócitos. Células ovais gram-positivas menores que eritrócitos, com hifas, foram observadas e identificadas como esporos de *Candida* (13).

Alguns estudos já mostraram a prevalência da VC que varia de 1,83 a 7,1% e a relação com os sintomas da CVV, mostrando que estes podem ser muito semelhantes estimando uma taxa de prevalência (15). Considerando a

similaridade dos sintomas e que pouco se sabe sobre os processos que levam a lise do epitélio vaginal, a caracterização do metabolismo envolvido no processo de degradação celular do epitélio escamoso vaginal irá colaborar para melhor entendimento sobre o mecanismo de patogenicidade dos metabólitos produzidos pelos lactobacilos.

Em alguns casos que a paciente relata sintomas muito semelhantes ao da CVV, não havendo resposta a antifúngicos, o diagnóstico para VC deve ser considerado, sendo necessária melhor investigação. Como mencionado anteriormente, os lactobacilos constroem uma barreira no ambiente vaginal contra patógenos, e também esta barreira atua contra o crescimento excessivo de *Candida* sp. bloqueando sua adesão às células do epitélio vaginal, por meio da competição por nutrientes. Às vezes pode ocorrer o supercrescimento de lactobacilos na vagina, que, em combinação com outras bactérias, podem causar danos em células intermediárias do epitélio vaginal, resultando em lise acentuada das células, característico em mulheres com VC (16).

Pacientes mal diagnosticadas como candidíase e que não respondem a intensos e repetitivos tratamentos antifúngicos por vezes são caracterizadas como pacientes com candidíase vulvovaginal de repetição. Indivíduos com diabetes mellitus, por apresentar altos níveis de glicose sérica, podem desenvolver VC por apresentar abundância de lactobacilos vaginais. Ainda, já foi observado que os sintomas da VC são mais intensos na fase lútea e que nesta fase há um aumento considerável de lactobacilos que colonizam o ambiente vaginal (15).

Em mulheres em idade reprodutiva é comum que haja a presença de lactobacilos que favorecem um pH ácido devido à produção de ácido láctico, enquanto as bactérias que se associam à VB, geralmente anaeróbicas, produzem ácidos graxos de cadeia curta, contribuindo assim para a disbiose vaginal e desenvolvimento da infecção (32-34). Estudos anteriores sobre VB mostraram que ácidos orgânicos como o acetato e succinato são metabólitos típicos produzidos por *Provetella* e *Mobiluncus spp* (35) e ainda, o malonato juntamente com o acetato diferenciam a VB do estado normal de uma paciente, bem como a diminuição de certos aminoácidos devido ao processo de descarboxilação de amins biogênicas (36). Ainda, em estudos *in vitro* foi constatado que o ácido succínico causa inibição potente da quimiotaxia,

enquanto o ácido acético causa uma inibição da migração leucocitária e isto justificaria a ausência de polimorfonucleares nos esfregaços vaginais de mulheres com VB (35). Os estudos sobre os metabólitos presentes no conteúdo vaginal fornecem elucidaciones fisiopatológicas sobre os distúrbios no microambiente vaginal, sendo esta uma perspectiva bastante utilizada nos estudos sobre VB.

Em condições normais o crescimento excessivo de lactobacilos na vagina pode apresentar uma alta disponibilidade de maltose, podendo atribuir este crescimento a possível síntese eficiente de glicogênio e/ou secreção de α -amilase pelo epitélio vaginal em condições normais (37), em contraponto, para as concentrações de glicose são superiores em pacientes normais se comparadas em pacientes com VB (38). Contudo, os estudos sobre o metaboloma em mulheres com VB possibilitou melhor compreensão sobre o metabolismo e a fisiopatologia da infecção, podendo assim partir para melhores avaliações e prognósticos para esta disbiose vaginal. Os estudos sobre os metabólitos e a relação destes com a fisiopatologia de condições ginecológicas, principalmente a relação dos ácidos orgânicos e o processo patológico, permite preencher muitas lacunas no conhecimento acerca do papel dos metabólitos nas infecções e disbioses vaginais.

Hialurona ou ácido hialurônico, por exemplo, é o principal componente da matriz extracelular, sendo responsável pelo seu preenchimento e, por manter a integridade do tecido e sua homeostase. Bioquimicamente, é um hidrato de carbono complexo formado por unidades repetidas de dissacárido de ácido D-glucorônico e N-acetil-D-glucosamina, portanto, proveniente do metabolismo da glicose (39).

Imai *et al.* 2014 (40) em um estudo *in vitro* pôde avaliar os processos fisiopatológicos que estariam relacionados à atuação do ácido butírico na infecção do HIV. Em culturas celulares, foi observado que o ácido butírico poderia induzir uma acetilação das histonas, ocasionando a replicação do HIV-1 por inibição de histonas deacetilases HDAC. A *Anaerococcus tetradius*, encontrada na vaginal, é uma das bactérias produtoras do ácido butírico, podendo estar envolvida na progressão da AIDS por reativação do pró-vírus do HIV latente.

A espectrometria de massas (EM) que teve início em 1897, pelo trabalho pioneiro de J. J. Thomson vem revolucionando ao longo dos anos as diferentes áreas da ciência. Com seus novos horizontes e amplas perspectivas de desenvolvimento, a EM vem se consolidando como uma ferramenta analítica extremamente versátil e essencial para a biologia, medicina, ciências agrárias, alimentos e outras. A EM é uma ferramenta analítica de fundamental importância disponível aos cientistas. A partir desta técnica é possível obter informações sobre a composição elementar de amostras, a estrutura molecular, a composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas, a estrutura e a composição de superfícies sólidas e as proporções isotópicas de átomos em amostras (41).

Na espectrometria de massas, é necessário que haja transferência de energia para causar ionização, formando íons livres em fase gasosa. O alcance e a utilidade do método de espectrometria de massa são ditados pelo processo de ionização. Após o processo de ionização, a amostra é decomposta, criando íons de massas menores que são detectados, gerando espectros de massa (42-44) (figura 4 e 5).

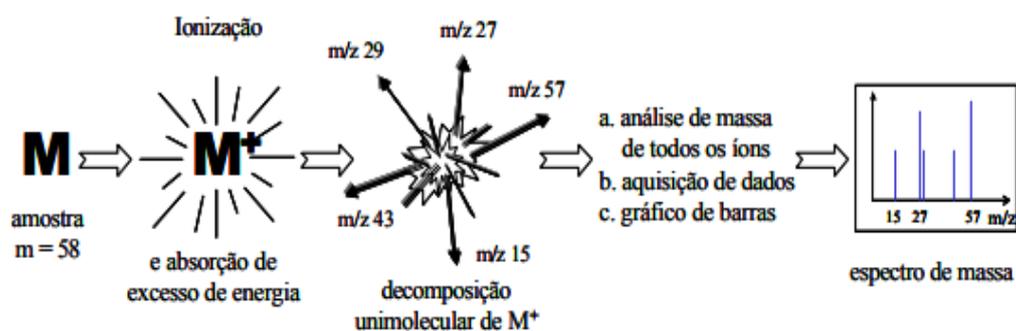


Figura 4. Análise por espectrometria de massa.

O espectrômetro de massa possui três componentes principais: uma fonte de íons, o analisador e o detector de massas. Os componentes de uma amostra são convertidos em íons na fonte de íons, por meio de um agente ionizante, que, são imediatamente acelerados em direção ao analisador de massa. O analisador de massa separa os íons de acordo com a sua relação massa/carga (m/z). Ao receber os íons que foram separados pelo analisador, o detector transforma a corrente de íons em sinais elétricos que são

processados, armazenados em um computador e analisados por um pesquisador (42-44).

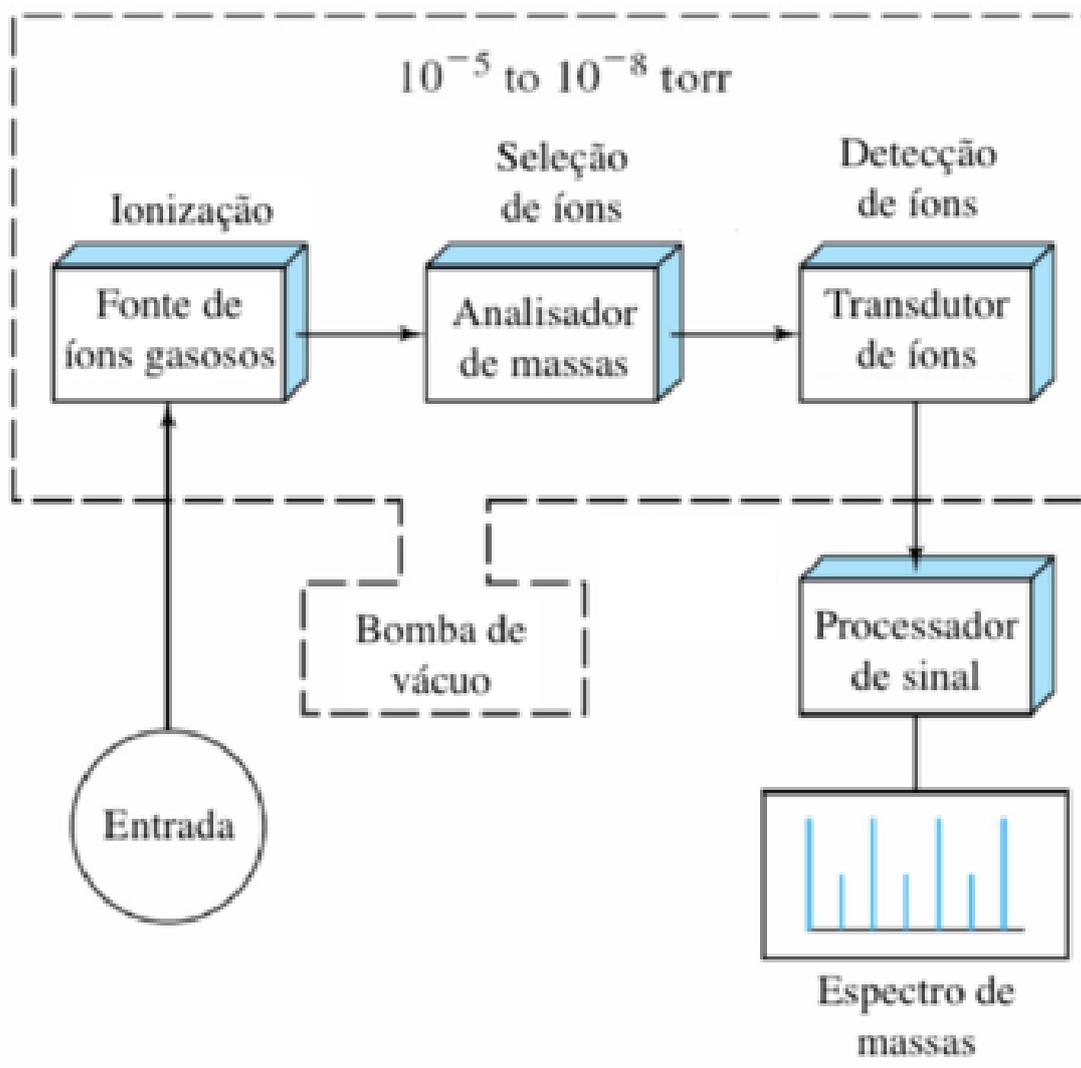


Figura 5. Espectrômetro de massa e seus componentes.

A aparência do espectro de massa de uma espécie molecular é altamente dependente do método de ionização usado. Os agentes ionizantes empregados em espectrometria de massa podem ser distribuídos nas categorias que requerem a amostra em fase gasosa e os agentes que provocam dessorção em amostras sólidas ou líquidas. O princípio básico e fundamental da EM é a medida da massa de uma molécula, a qual se obtém os múltiplos níveis e diferentes tipos de informação. Os íons gerados são focados em um feixe e direcionados para uma célula de colisão, podendo ser induzida

por sua dissociação, que, posteriormente, as massas dos íons intactos ou fragmentados são analisados com base em sua relação m/z (41).

A ionização por eletrospray (ESI) é um dos principais métodos de ionização de biomoléculas, onde os metabólitos são submetidos a fortes correntes elétricas, provocando a ejeção de gotículas líquidas na fase gasosa, seguido de dessolvatação e acumulação de carga na superfície do metabólito a ser analisado. O ESI baseia-se na produção de íons, essencialmente em dois passos: dispersão de gotas altamente carregadas, quase a pressão atmosférica, seguida por condições que permitam a evaporação da gota. A implementação de uma fonte de electro spray é bastante simples se comparada com outras fontes utilizadas em espectrometria de massas. É necessária uma fonte de alta tensão que esteja em contato com a solução contendo os analitos. Esta solução é transmitida através do capilar, onde é aplicado um potencial positivo ou negativo forçando um processo de oxirredução e, conseqüentemente, a formação de algumas espécies sem seus contra-íons. Assim, a gota sendo formada na ponta do capilar estará enriquecida por íons positivos ou negativos, dependendo do potencial aplicado. Conforme a densidade de carga aumenta na gota, presa à ponta do capilar, o campo elétrico formado entre o capilar e o contraeletrodo aumenta, provocando uma deformação na gota. A gota ganha forma de um cone, o qual é denominado de cone de Taylor. Quando a densidade de carga supera a tensão superficial, a gota se desprende do capilar subdividindo-se. A frequência deste último processo depende da magnitude do campo elétrico, da tensão superficial do solvente e da condutividade da solução. Como resultado final, os íons tornam-se completamente dessolvatados. Pode-se presumir que ESI envolve apenas o rompimento gradual de interações não covalentes, principalmente a remoção de moléculas de solventes (45-47). A capacidade de acoplamento de uma coluna de cromatografia líquida à agulha de eletro-pulverização garante uma vantagem adicional ao ESI. Esta técnica conhecida como LC-MS permite a separação dos metabólitos antes da sua entrada no espectrômetro de massa, um método particularmente relevante na análise de amostras de moléculas complexas. Após a ionização da amostra, os íons gerados entram no espectrômetro de massa sob alto vácuo e são separados com base em m/z por um analisador de massa (48).

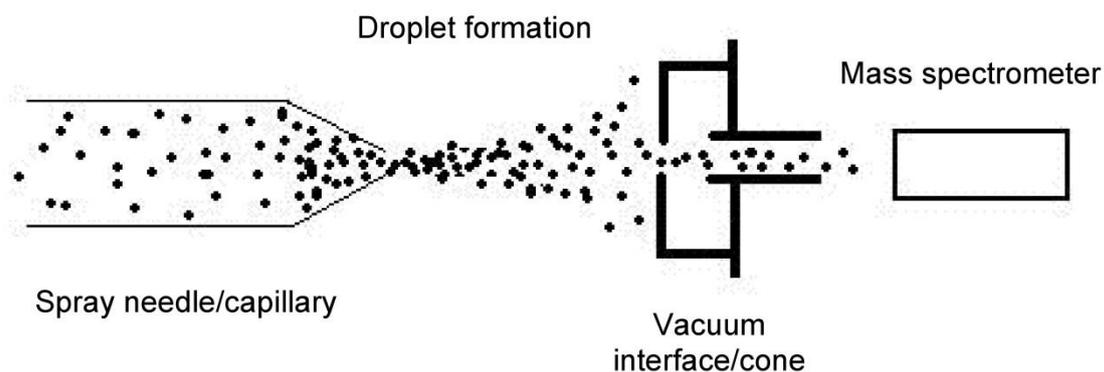


Figura 6. Processo de ESI-MS.

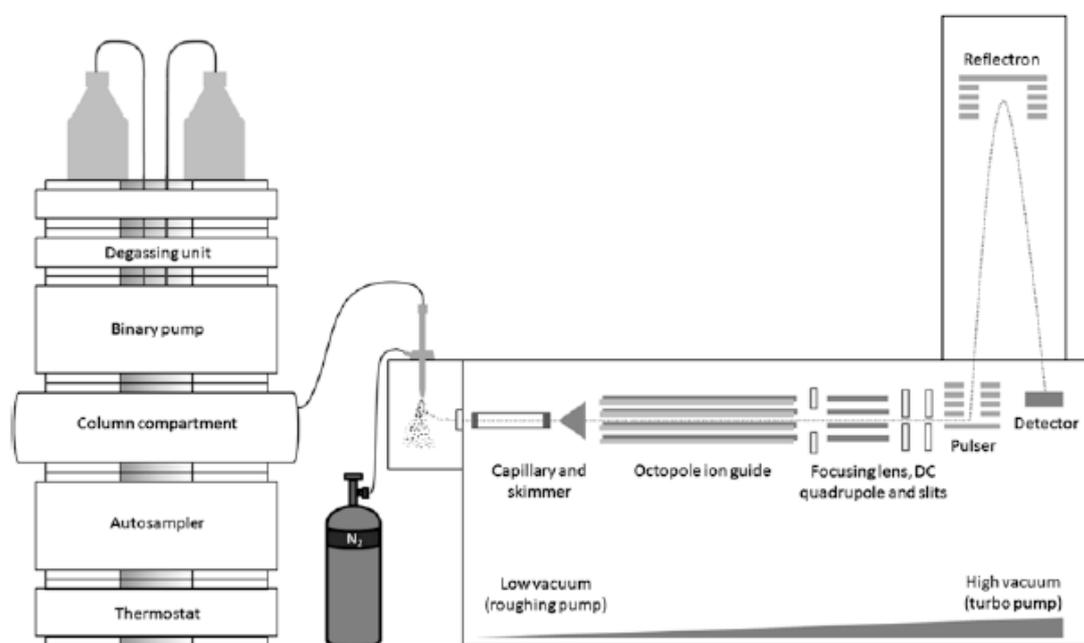


Figura 7. ESI-MS-TOF Depois que os íons de análise são entregues à fonte de íons, a ESI facilita sua transferência (a partir do Líquido para a fase gasosa) para a entrada do MS. A partir daí, são transmitidos para o TOF (através de um capilar de vidro, um guia de íons e lentes de focagem) e são pulsados no tubo de voo e são refletidos (por tensões específicas) a caminho do detector. Os íons mais claros chegam primeiro ao detector. Esta ilustração baseia-se em um sistema Agilent LC-ESI-quad MS (49).

Para obtenção do fingerprint metabólito da amostra em estudo a técnica de LC-ESI-MS é utilizada para análise de amostras biológicas complexas. A técnica de Fingerprint por ESI permite a avaliação total e rápida da amostra biológica para discriminação dos diferentes grupos de metabólitos (padrões), sendo possível a triagem e classificação das amostras analisadas. Utiliza-se a separação da fase condensada da carga do material a ser analisado e a separação de íons para produzir fase de vapores. A separação cromatográfica

prévia pode reduzir a complexidade e amenizar os efeitos de matriz durante a ionização. As colunas mais utilizadas na separação dos metabólitos são as C18. Uma boa separação cromatográfica colabora para uma melhora na sensibilidade da detecção por MS e qualidade dos dados adquiridos devido à redução de ruído (50).

Dentre os diversos tipos de analisadores de massas, o quadrupolo, tempo de voo (TOF – do inglês *Time of Flight*) e Orbitrap são os mais comuns, tendo pontos fortes e fracos em relação aos princípios de medição da razão m/z dos íons por meio da dispersão dos íons com base no seu tempo e energia cinética, velocidade dos íons (TOF), transmissão e movimentação dos íons através de um campo eletrodinâmico. Em equipamentos quadrupolos a separação direta dos íons, de acordo com sua m/z , é feita por meio de potenciais de corrente contínua e radiofrequência. Basicamente, o princípio de operação do tempo de voo no espectrômetro de massa envolve a medida do tempo que um íon leva para viajar até o detector de massas. A aceleração dos íons, portanto, ocorre mediante a energia dada, que logo são separados de acordo com sua velocidade. Os analisadores podem ser utilizados de forma independente ou acoplados em conjunto em um instrumento híbrido, facilitando a análise dos metabólitos (43, 44, 51-54).

O uso de um solvente orgânico miscível com água (acetonitrila e/ou metanol) favorecem a separação cromatográfica. Para o ESI no modo positivo, podem ser adicionados ácidos voláteis (mais comuns são os ácidos fórmico ou acético) para protonar o analito. No ESI negativo, utiliza-se hidróxido de amônio, o que favorece a desprotonação dos analitos. A adição destes aditivos estabelecem os padrões necessários para uma ionização, para o modo positivo ou negativo, de forma eficiente, porém devem ser adicionados em baixas concentrações para evitar possíveis supressões na ionização dos compostos a serem analisados. O ESI, portanto atua como uma ferramenta que se aplica de forma eficiente a compostos de polaridade média e alta, podendo ser aplicada em diferentes áreas da ciência (55-57).

Os espectrômetros de massas híbridos são caracterizados pela combinação de dois ou mais analisadores. TOF e Orbitrap, por exemplo, são espectrômetros de massas de alta e ultra-alta resolução, respectivamente, que fornecem as medidas de massa exata que auxiliam na identificação dos

metabólitos de interesse. Os estudos de metabolômica, de maneira geral, utilizam técnicas de separação antes da análise por espectrometria de massas. O HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), permite a separação de compostos com uma ampla faixa de polaridades, por eluição isocrática ou eluição com gradiente. A eluição isocrática ocorre de forma que a composição da fase móvel não varia durante a cromatografia e a eluição com gradiente se dá pela variação da fase móvel durante a análise cromatográfica. A etapa de separação cromatográfica acrescenta uma nova dimensão a análise, mediante ao tempo de retenção dos compostos que é baseada pela utilização de fases estacionárias onde partículas menores, que operam em pressões superiores podem expressar separações dos compostos com uma ampla faixa de polaridade (41, 58, 59).

A metabolômica surgiu como uma estratégia analítica para o estudo do metabolismo em um nível global, para um dado sistema biológico, sendo este termo introduzido no ano de 2000 (60, 61). A integração de dados de metabolômica com as demais “ômicas” pode ser aplicada para a construção de redes moleculares, as quais podem ajudar elucidar os diferentes processos bioquímicos (62). O metaboloma vem sendo estudado em diversos sistemas orgânicos a fim de promover melhores entendimentos sobre o comportamento da microbiota e sua contribuição para o metabolismo do hospedeiro, podendo identificar possíveis biomarcadores para diversas patologias (63-65).

A análise do perfil de amostras de pequenas moléculas de sistemas biológicos complexos fornece uma representação significativa para a biologia sistêmica. Recentemente, com o desenvolvimento de plataformas analíticas acarretou para que o volume de informações metabólicas aumentasse significativamente a partir de amostras e suas comparações com os outros sistemas analíticos atuais (66). A visão biologia sistêmica sugere que a maior parte dos componentes genéticos susceptíveis a doenças não estão relacionados a um único gene, mas nas interações com outros genes, bem como com o meio ambiente (67).

O estudo metabolômico consiste na caracterização do perfil metabólico de organismos, considerando sua composição e dinâmica frente a fatores genéticos, fisiológicos e ambientais, que, por meio da EM permite uma

análise qualitativa e quantitativa dos metabólitos presentes em um organismo ou sistema biológico (68, 69). Um sistema biológico ou organismo possuem um alto grau de diversidade de seus metabólitos, podendo ser verificado pela variação de moléculas orgânicas e inorgânicas que os compõem. Esta variação da massa molecular se dá até 1500 Da (*Daltons*), de polaridade e volatilidade. As moléculas presentes nas células participam de diferentes bioprocessos que participam de reações metabólicas para a manutenção, crescimento e função celular (70). Além dos metabolitos serem caracterizados como produtos finais de processos celulares em condições fisiológicas normais do organismo, estes podem sofrer alterações em sua concentração mediante a estímulos externos ou desregulação do próprio organismo. Diante deste exposto a metabolômica atua na busca para explicar tais modificações de um ponto de vista metabólico, sendo bastante utilizada para a descoberta de potenciais biomarcadores para diversas doenças, colaborando para a comunidade científica e para a medicina no aperfeiçoamento prognóstico e tratamento (60).

A nível celular, o acesso dos sistemas possivelmente envolve um modelo celular global de comunicação que relaciona redes metabólicas baseadas na metabolômica, proteômica, genômica e lipidômica e outras. No cenário clínico, a abordagem dos sistemas pode envolver a identificação de perfis moleculares associados à progressão de uma determinada doença, além de aplicar modelos para ajudar a identificar os mecanismos biológicos e fisiopatológicos. As abordagens de biologia sistêmica, portanto, objetivam o estudo dos processos de saúde e doença desde os níveis celulares a clínicos (71).

A lipidômica surgiu como um segmento intimamente relacionado à metabolômica e é dedicada ao estudo global do lipidoma, incluindo sua composição bioquímica e redes lipídicas nos sistemas biológicos (72-75). Atualmente, os estudos lipidômicos tendem a considerar os lipídios como parte de um sistema integrado a fim de compreendê-los de maneira mais ampla, não somente como estruturas moleculares individuais, e relaciona-los com processos sistêmicos e fisiopatológicos (72). Contudo, a lipidômica pode colaborar efetivamente e de forma objetiva para melhor entendimento da fisiopatologia da CVV e CV, relacionando os lipídios presentes no conteúdo

vaginal de mulheres que apresentam esta condição, com os fatores clínicos e sintomatológicos dessas pacientes.

Os perfis lipídicos são caracterizados pelas principais classes de lipídios, tais como ésteres de colesterol, ceramidas, mono (MG), di (DG) e triacilgliceróis (TG), fosfolipídios de membrana, como esfingomielinas (SM), fosfatidilcolinas (PC), fosfatidiletanolaminas (PE), fosfatidilserinas (PS) e lisofosfolipídios. Ainda, estudos de metaboloma *in targeted*, que possibilita uma análise de moléculas alvo, analisa algumas classes de lipídios possuem difícil identificação, tais como esteróides, esteróis, ácidos biliares, ácidos gordurosos, lipídios de sinalização, como eicosanóides, bem como lipídios polares e lipídios de inositol (71). Os ácidos graxos são lipídios de estrutura molecular simples e são considerados um dos lipídios mais importantes, pois, são elementos básicos de todos os lipídios. Estruturalmente, os ácidos graxos possuem cadeias de hidrocarbonetos heterólogos, saturados ou insaturados, podendo ter de 14 a 24 átomos de carbono em sua cadeia. Estes são precursores de várias moléculas lipídicas bioativas. Os lipídios constituem cerca de 50% da massa da maioria das membranas da célula animal, exibindo um alto grau de especialização nos diferentes compartimentos celulares específicos, podendo haver rearranjos no metabolismo lipídico para manter a homeostase fisiológica e em transtornos ambientais (76, 77). Os lipídios por apresentarem estruturas polares e apolares são então considerados como moléculas anfipáticas. A cabeça polar é composta por glicerol, um fosfato e um radical, que pode ser uma colina, etanolamina, serina ou inositol. (77, 78).

Entre os vários tipos de lipídios existentes nas membranas biológicas, os mais abundantes são os fosfolipídios. Em menores quantidades são encontrados os esfingolipídios e o colesterol. Os fosfolipídios apresentam uma cabeça polar (hidrofílica) e duas cabeças apolares (hidrofóbicas) que são compostas por ácidos graxos. Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos de cadeia longa, geralmente contendo de 14 a 24 carbonos, e nas membranas biológicas entre 16 e 18 carbonos. Os ácidos graxos podem ser saturados ou insaturados, onde a quantidade de insaturações pode influenciar na espessura da bicamada lipídica e na fluidez da membrana (figura 8).

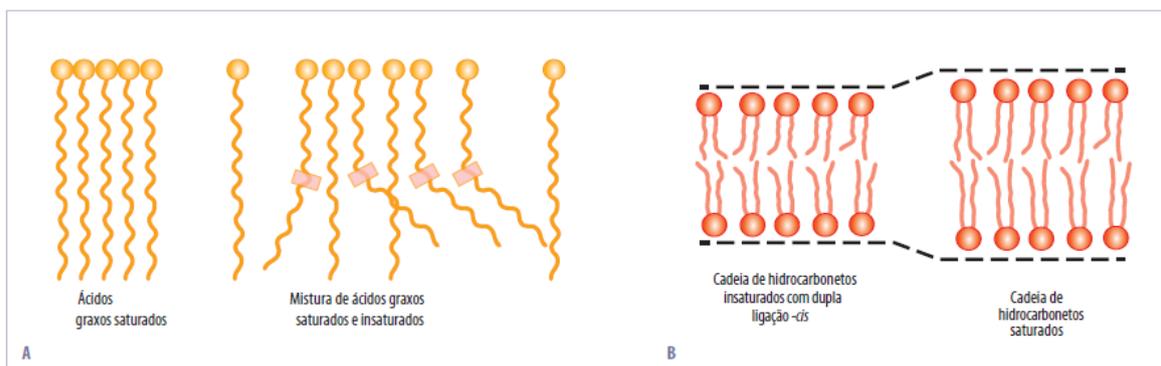


Figura 8. Relação entre o nível satural dos lipídios e as propriedades da membrana. A. Pode ser visto que, com o aumento das insaturações, aumentam-se os espaços entre os fosfolipídios, tendo assim impacto sobre a permeabilidade da bicamada. B. O teor de saturação/insaturação influencia na espessura da bicamada. Modificada de Leninger et al., 2006. Extraído de Carvalho e Recco-Pimentel, 2013 (79).

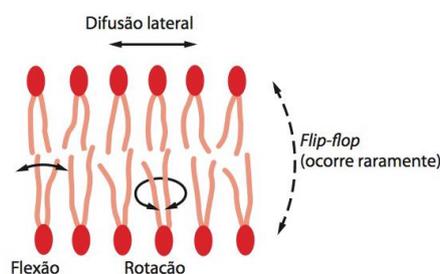
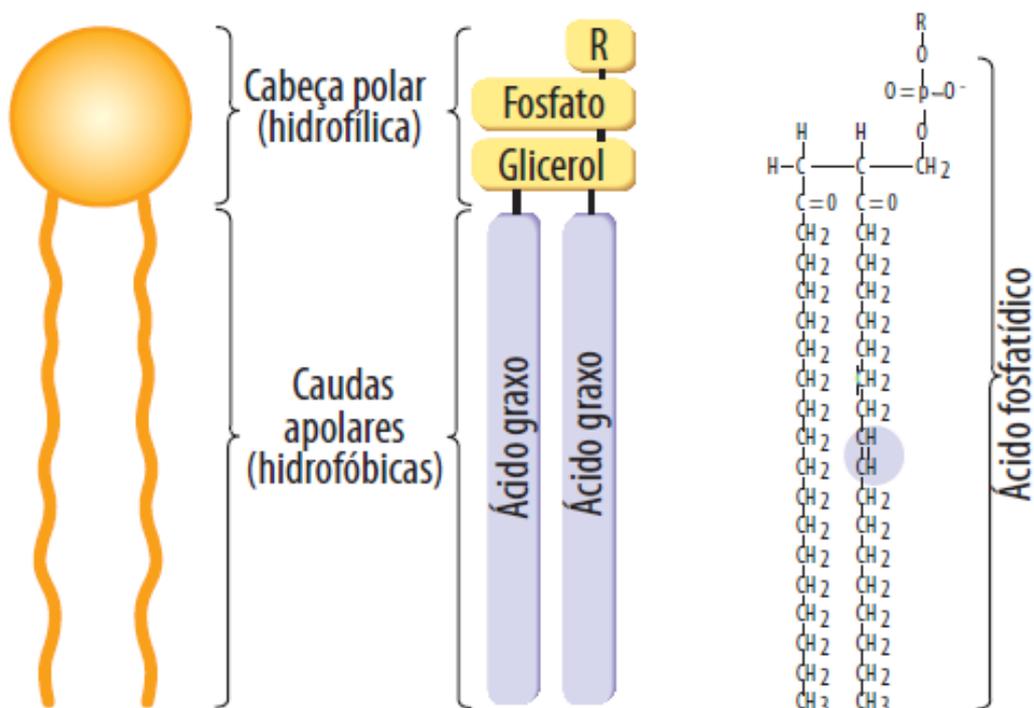


Figura 9. Movimentação lipídica. Modificado e extraído de Alberts et. al, 2008 (77).

	Nome comum	Esqueleto carbônico	Estrutura*	Nome sistemático (IUPAC)	Ponto de fusão (°C)
Saturados	Ac. láurico	12:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	Ac. n - dodecanoico	44,2
	Ac. mirístico	14:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	Ac. n - tetradecanoico	53,9
	Ac. palmítico	16:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	Ac. n - hexadecanoico	63,1
	Ac. esteárico	18:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	Ac. n - octadecanoico	69,6
	Ac. araquídico	20:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	Ac. n - eicosanoico	76,5
	Ac. behênico	22:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$	Ac. n - docosanoico	81,0
	Ac. lignocérico	24:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$	Ac. n - tetracosanoico	86,0
Insaturados	Ac. palmitoleico	16:1 (D ⁹), n-7 ou w-7	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Ac. cis 9-hexadecenoico	-0,5
	Ac. oleico	18:1 (D ⁹), n-9 ou w-9	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Ac. cis 9-octadecenoico	13,4
	Ac. linoleico	18:2 (D ^{9,12}), n-6 ou w-6	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Ac. cis, cis 9, 12 - octadecadienoico	-5,0
	Ac. linolênico	18:3 (D ^{9,12,15}), n-3 ou w-3	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Ac. cis, cis, cis 9, 12, 15-octadecatrienoico	-11,0
	Ac. araquidônico	20:4 (D ^{5,8,11,14}), n-6 ou w-6	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	Ac. cis, cis, cis 5, 8, 11, 14-icosatetraenoico	-49,5
	Ac. nervônico	24:1 (D ¹⁵), n-9 ou w-9	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$	Ac. cis 15-tetracosenoico	39

Figura 10. Principais ácidos graxos encontrados nas membranas celulares. Modificado de Leninger et al. Extraído de Carvalho e Recco-Pimentel, 2013 (79).

Mediante ao radical presente na cabeça lipídica, fosfolipídios podem ser classificados como fosfatidilcolina ou lecitina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e fosfatidilinositol. Estes lipídios se dispõem de forma assimétrica nas membranas biológicas variando de acordo com o tipo celular (79). O difosfatidilglicerol ou cardiolipina é um tipo de fosfoglicerídeo duplo, com quatro cadeias de ácidos graxos, sendo este encontrado apenas na membrana interna de mitocôndrias, fazendo com que haja menor fluidez da membrana, e, conseqüentemente menor permeabilidade. Os esfingolipídios são formados por uma cabeça polar e duas polares, onde a cabeça é constituída por esfingosina e por um álcool aminado e as caudas apolares apresentam uma cadeia de ácido graxo e a porção hidrofóbica da própria esfingosina. Os esfingolipídios não apresentam glicerol e estão encontrados em três subclasses: esfingomielinas, cerebrosídeos e gangliosídeos. O colesterol é um esteroide, também componente das membranas biológicas composto por quatro anéis fundidos derivado do ciclo pentanoperidroferantreno, sendo esta molécula relacionada com a fluidez da membrana celular, devido sua inserção na bicamada lipídica, dificultando o transporte de moléculas (79).



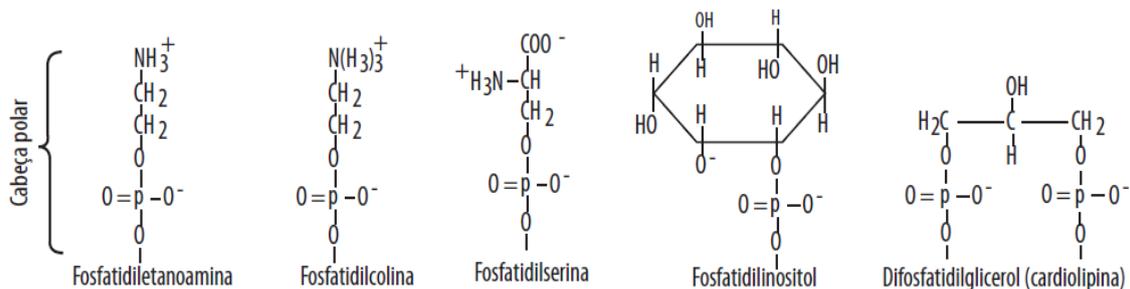


Figura 11. Principais fosfolipídios das biomembranas. Os fosfolipídios são formados por uma cauda apolar, composta pelas cadeias de ácidos graxos, e uma cabeça polar, constituída pelo glicerol, um fosfato e um álcool. Normalmente nesse radical são encontradas etanoamina, colina e serina. No caso da cardiolipina, um lipídio encontrado na membrana interna das mitocôndrias, o grupo R é formado por uma molécula de glicerol, constituindo assim um fosfolipídio “duplo”. Na composição dos lipídios, os ácidos graxos, o glicerol e o fosfato recebem o nome de ácido fosfatídico. No entanto, o que dá nome ao fosfolipídio é o radical que ele apresenta no grupo R. Extraído de Carvalho e Recco-Pimentel, 2013 (79).

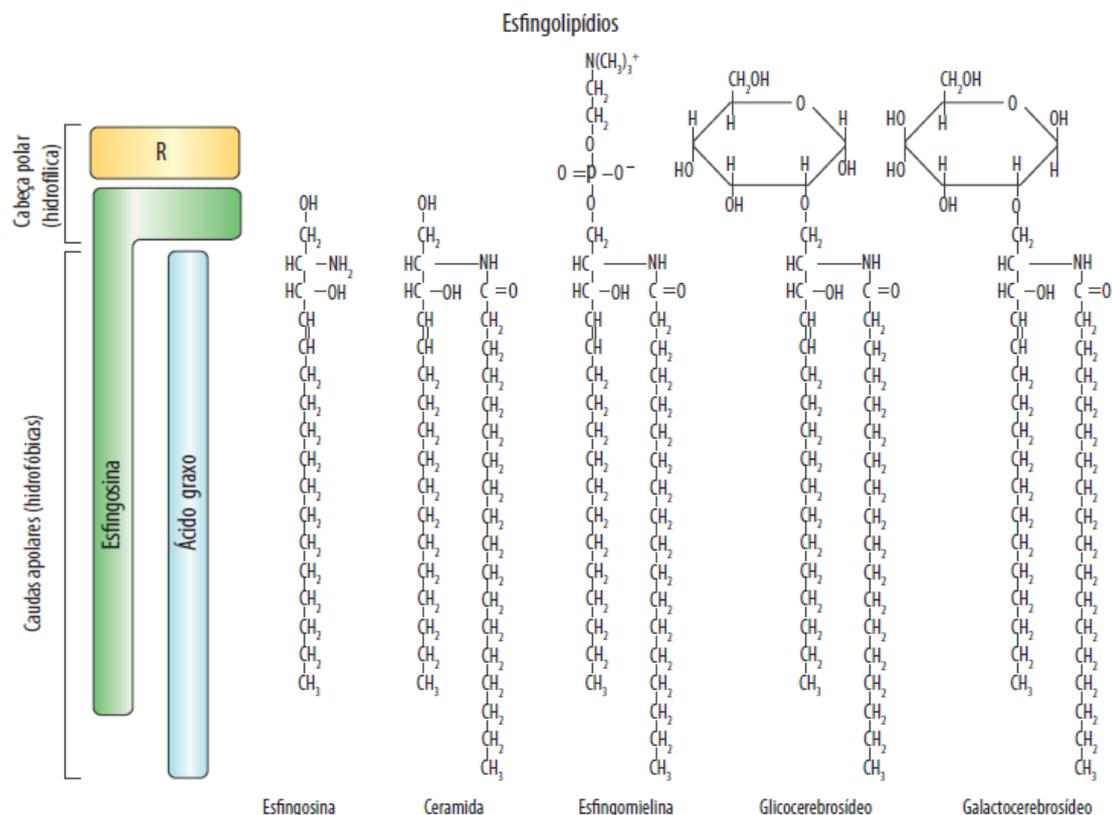


Figura 12. Outros tipos de lipídios encontrados nas membranas biológicas. Os esfingolipídios, que são compostos por uma cabeça polar, que pode ou não apresentar um radical fosfato, e uma cadeia de ácido graxo. A esfingosina participa da composição tanto da cabeça polar como das caudas apolares. Os cerebrosídeos apresentam um açúcar, glicose ou galactose, na cabeça polar. Os gangliosídeos possuem estrutura semelhante aos cerebrosídeos, ocorrendo porém um padrão de glicosilação mais complexo, com vários oligossacarídeos. É mostrado também o colesterol, um derivado do ciclo pentanoperidrofenantreno. Extraído de Carvalho e Recco-Pimentel, 2013 (79).

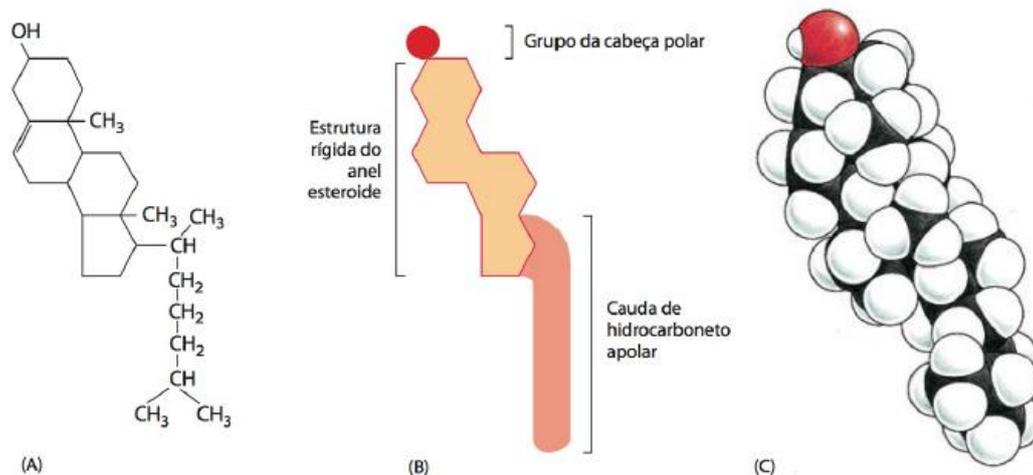


Figura 13. Estrutura do colesterol. (A) fórmula molecular, (B) esquema e (C) modelo de preenchimento espacial. Extraído de Alberts *et al.*, 2008 (77).

O equilíbrio do ecossistema vaginal é de fundamental importância para a manutenção dos processos de saúde e doença na fisiologia do trato genital feminino. Uma vez que o ambiente vaginal é afetado por fatores fisiológicos e/ou ambientais, a microbiota pode ser acometida por diversos processos metabólicos por meio de produtos orgânicos e inorgânicos provenientes do metabolismo bacteriano.

A avaliação dos lipídios presentes no conteúdo vaginal de mulheres com CVV e VC promove a elucidação dos mecanismos fisiopatológicos dessas condições, que, por meio das relações entre o comportamento lipídico frente ao descontrole no microambiente vaginal que levam à CVV e VC propõem novos prognósticos, instituindo uma nova linha de pesquisa que visa englobar não apenas os contextos microbiológicos que definem o desequilíbrio do ecossistema vaginal, mas sim o metabolismo envolvido.

Mediante aos estudos recentes sobre os processos fisiológicos e as interações internas e externas sob o ambiente vaginal, muitas informações sobre o mecanismo fisiopatológico da VB, suas interações com o epitélio vaginal, metabólitos provenientes da atuação das bactérias anaeróbicas e até mesmo estudos acerca da especificidade bacteriana presente na infecção já são sobejamente conhecidos. No entanto, apesar de existirem trabalhos sobre as outras disbioses mais comuns, a VC ainda não é bem estudada, bem como não são totalmente conhecidas as possíveis interações lipídicas com a fisiopatologia da candidíase.

Em um indivíduo saudável, há um equilíbrio entre os microrganismos presentes, onde organismos patogênicos e não patogênicos podem ser encontrados de forma harmônica. Quando uma infecção está instalada o equilíbrio encontra-se perturbado, acarretando em possíveis mudanças drásticas na microbiota (7). Relacionando este contexto ao ambiente vaginal, já são conhecidas as características microbiológicas que levam às disbioses por *Candida spp*, *Gardnerella vaginalis* e *Mobiluncus* por exemplo. Porém, ainda existe uma lacuna no conhecimento sobre os processos metabólicos que podem levar à CVV, e principalmente para à VC que até o momento foi muito pouco estudada.

Este estudo foi desenvolvido para determinar o lipidoma do conteúdo vaginal de mulheres com disbioses vaginais, para possibilitar entendimento mais amplo acerca do ecossistema vaginal, suas características metabólicas e os processos envolvidos na fisiopatogênese da CVV e VC.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar o perfil lipídico vaginal de mulheres com candidíase vulvovaginal e vaginose citolítica.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar os principais lipídios presentes no conteúdo vaginal de mulheres com candidíase vulvovaginal, vaginose citolítica e mulheres normais;
- Comparar a concentração dos principais lipídeos encontrados na candidíase vulvovaginal, vaginose citolítica e mulheres normais relacionando-os com seu processo fisiológico e/ou fisiopatológico.

3. METODOLOGIA

3.1. Seleção dos sujeitos

Mulheres sexualmente ativas entre 18 a 45 anos atendidas no Ambulatório de Infecções Genitais do CAISM-UNICAMP de Novembro de 2016 a Março de 2017 foram convidadas a participar do estudo. Conforme rotina do ambulatório, todas as pacientes foram submetidas a anamnese detalhada e exame ginecológico. Por meio de um swab estéril de Dacron coletou-se material da parede vaginal para identificação de doenças cervicovaginais, verificação das condições do ecossistema vaginal em 42 mulheres. Os casos suspeitos de endocervicites, com presença de sangue, vaginose bacteriana, tricomoníase e infecções mistas foram descartados. O estudo do lipidoma vaginal foi, portanto realizado em 24 mulheres, sendo 8 com CVV, 8 com VC e outras 8 mulheres normais (nl). Todas as mulheres selecionadas assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa nº CAAE: 60648016.8.0000.5404.

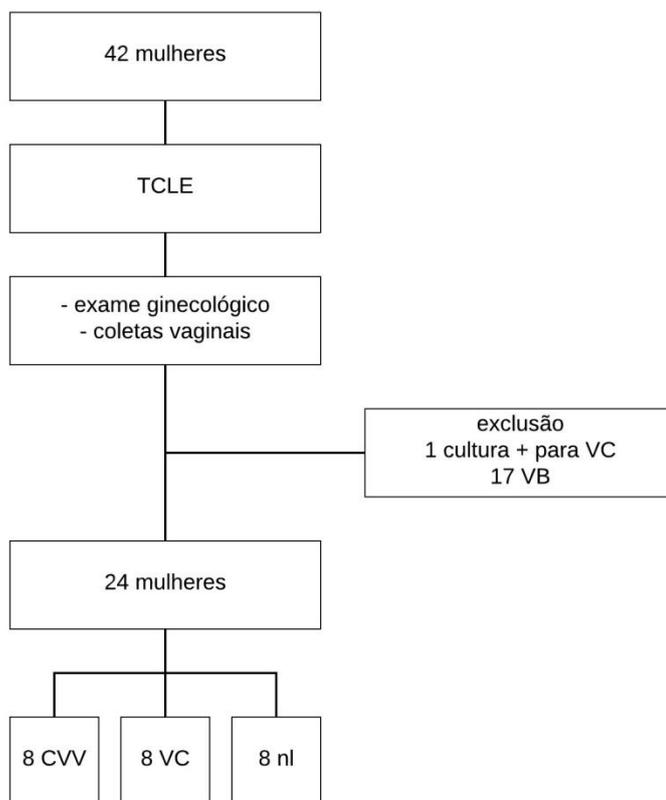


Figura 14. Fluxograma de inclusão das mulheres no estudo

3.2. Identificação e classificação de candidíase vulvovaginal e vaginose citolítica

Mensuração do pH vaginal: este teste foi realizado com fita colorimétrica da marca MERCK® (com faixa de variação que abrangem os valores de 4,0 a 7 com intervalos de variação de 0,3) colocando-se a fita na terço médio da parede vaginal por um minuto e evitando o contato com o muco cervical, sendo retirado e verificando, de acordo com a escala, o pH vaginal naquele momento.

Bacterioscopia por coloração de Gram: outra amostra do conteúdo vaginal foi espalhada em lâmina de vidro deixando-se secar para posterior coloração pelo método de coloração de Gram. Este exame define o tipo de flora vaginal (1, 2 ou 3), identifica a celularidade no esfregaço, morfologia bacteriana, quantifica os leucócitos caracterizando a presença ou não de inflamação, identifica patógenos como fungos, tricomonas, entre outros, além de realizar o score de Nugent para diagnóstico da vaginose bacteriana (80).

Cultura para fungo: O ágar Sabouraud é recomendado para o cultivo, isolamento e identificação de fungos patogênicos e leveduras. O ótimo crescimento dos fungos se deve às altas concentrações de carboidratos. O meio não dispõe de inibidores de microflora acompanhante, mas agentes inibidores podem ser adicionados. Os inibidores mais utilizados em associação com o ágar Sabouraud são: ciclohexemida (500mg/L), penicilina (20.000UI/L), estreptomicina (40mg/L), cloranfenicol (40mg/L). Para a detecção de leveduras, foi adicionado 40mg/L de neomicina e 20.000UI/L de penicilina. Para o isolamento de *Candida albicans* utilizou-se Sabouraud com 4% de destrose adicionado de cloreto de trifeniltetrazolio (TTC) (100mg/L), mediante ao pH do meio, levemente ácido, inibindo o desenvolvimento de algumas bactérias e de outras espécies de fungos. O período de incubação deste ágar foi de no mínimo 3 dias a 25°C. Uma amostra do conteúdo vaginal foi colhida da terço médio da parede vaginal com swab estéril e semeada em meio de Sabouraud, encaminhada para o Laboratório de Patologia Clínica do HC (Laboratório de Microbiologia), onde foram processadas, analisadas e lançadas no sistema do

CAISM - Sigla do exame: CFUNGO. Os resultados do exame CFUNGO de cada paciente foram acessados no Portal HC e/ou no prontuário eletrônico.

3.3. Análise lipidômica do conteúdo vaginal

Foram coletadas duas amostras do conteúdo vaginal de cada paciente utilizando swabs estéreis e imediatamente armazenados em tubos Falcon, sem meio para transporte, a -80°C até o processamento. Para extração dos lipídios, cada amostra foi ressuspendida em 1 ml de solução 1:2 de CHCl_3 :MeOH (Sigma, Basileia, Suíça), seguida da adição de 0,33ml de CHCl_3 e 0,33ml de água desionizada e depois agitada durante 5 minutos seguido de centrifugação a 13.000 rpm durante 5 min. A camada inferior da amostra é a que contém lipídios, sendo esta transferida para outro tubo. Todas as amostras foram secas usando *SpeedVac* durante 30 minutos a 30°C e mantidas congeladas a -80°C até a data da análise.

3.4. Aquisição dos dados

A separação cromatográfica foi realizada por um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência Agilent 1290 Infinity (UHPLC) (Agilent, Santa Clara, Califórnia, Estados Unidos) e a eluição cromatográfica foi realizada em coluna Kinetex C18 (4.6 mm x 50 mm x 2.6 μm) (Phenomenex Torrance, United States). Utilizou-se como fase móvel água com 0,1% de ácido fórmico (fase A) e metanol (fase B) e para o modo positivo; para o modo negativo, foi utilizada a mesma fase B e para a fase A foi utilizado Acetato de Amônio 5 mM. A taxa de fluxo da fase móvel foi de 0,3 ml.min⁻¹ e o volume da injeção 2 μL . O gradiente da fase móvel começou com 5% de B mudando linearmente para 95% de B em 15 minutos e retornando à composição inicial aos 15 minutos, permanecendo nesta composição durante 5 minutos para a corrida posterior e este gradiente foi utilizado tanto para o modo positivo quanto para o modo negativo.

3.5. Espectrometria de massas

Para obtenção dos espectros de massas foi utilizado espectrômetro de massas híbrido com analisador de massas do tipo QTOF 6550 (Agilent), onde as amostras foram analisadas no modo positivo e no modo negativo de ionização. Os parâmetros instrumentais da fonte de ionização por electrospray utilizados foram: *V_{Cap}* de 3.000 V; voltagem do *fragmentor* de 100 V, voltagem do *skimmer* de 65 V, OCT 1 RF *V_{pp}* de 750 V, *Gas Temperature* de 290°C, *Sheath Gas Temperature* de 350°C, *Sheath Gas Flow* de 12 L.min⁻¹ e foram usados nos modos positivo e negativo. Os espectros de massa foram adquiridos no modo centroide e a faixa de massas utilizada para a aquisição dos dados foi de 50-1700 Da.

3.6. Processamento dos dados

Os dados brutos obtidos foram convertidos para o formato *mzData* usando o conversor disponível no software MassHunter Qualitative (Agilent), eliminando as interferências isotópicas. Após a conversão, os arquivos foram importados para o software XCMS online (<https://xcmsonline.scripps.edu/>) (81) for peak detection, alignment, retention time correction and demais pré-processamentos pertinentes.

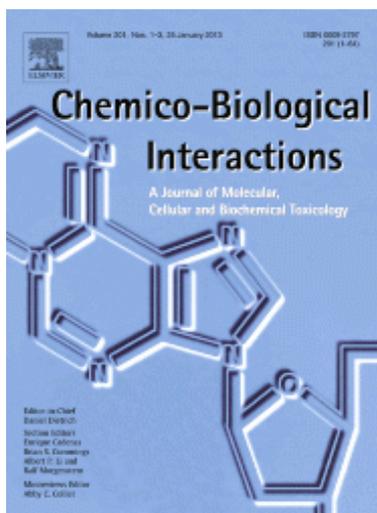
A partir dos dados obtidos pelo software XCMS *online* foi gerada uma tabela em Excel onde os metabólitos com valor de $p > 0,05$ (ANOVA) foram considerados como representativos para análise na plataforma MetaboAnalyst 3.0 (www.metaboanalyst.ca) (82). No MetaboAnalyst foi realizada a normalização dos dados, escalamento e análises estatísticas multivariadas, sendo realizada análise exploratória de dados utilizando os métodos não supervisionados de Análise de Componentes Principais (PCA) e análise discriminante por quadrados mínimos parciais (PLS-DA), possibilitando a caracterização de potenciais biomarcadores por resultados expressos no índice VIP maior que 1.0. Com base nos metabólitos apresentados como potenciais biomarcadores pelo índice VIP e loading plot, a identificação lipídica se deu pela medida da massa exata e o perfil de eluição, sendo realizada uma busca nas bases de dados do pelo composto em questão e suas aplicações biológicas. As bases de dados utilizadas foram

METLIN (81), Human Metabolome Data Base (HMDB) (83) e Lipid Maps (84).

3.7. Análise estatística dos dados clínicos e sócio demográficos

Para descrever o perfil da amostra segundo as variáveis em estudo foram feitas tabelas de frequência das variáveis categóricas (cor da pele, parceiros, escolaridade, etc.), com valores de frequência absoluta (n) e percentual (%). As análises estatísticas descritivas das variáveis numéricas como idade e tempo de estudo, por exemplo, foram descritas por valores de média, desvio padrão, valores mínimo e máximo, mediana e quartis. Para comparação das variáveis categóricas entre os três grupos estudados (VC, CVV e controles) foi utilizado o teste exato de Fisher (para valores esperados menores que 5) e para a comparação das variáveis numéricas entre os três grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, devido à ausência de distribuição normal das variáveis e tamanho reduzido dos grupos. O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja, $P < 0.05$.

4. RESULTADOS



Artigo 1.

Vaginal lipidomics of women with vulvovaginal candidiasis and cytolytic vaginosis

Sanches, J.M., Giraldo, P.C., Amaral, R., Eberlin, M.N., Marques, L.A., Migliorini, I., Nakahira, M., Bieleveld, M.J.M., Discacciati, M.G.

Submetido: Chemico-Biological Interactions. Outubro de 2017

Fator de impacto: 3.143

Manuscript Details

Manuscript number	CHEMBIOINT_2017_918
Title	Vaginal lipidomics of women with vulvovaginal candidiasis and cytolytic vaginosis
Article type	Research Paper

Abstract

Objective: To characterize the lipid profile in vaginal discharge of women with vulvovaginal candidiasis, cytolytic vaginosis, or no vaginal infection or dysbiosis. **Design:** Cross-sectional study. **Setting:** Genital Infections Ambulatory, Department of Tocogynecology, University of Campinas, Campinas, São Paulo–Brazil. **Sample:** Twenty-four women were included in this study: eight with vulvovaginal candidiasis, eight with cytolytic vaginosis and eight with no vaginal infections or dysbiosis (control group). **Methods:** The lipid profile in vaginal discharge of the different study groups was determined by liquid chromatography-mass spectrometry and further analyzed with MetaboAnalyst 3.0 platform. **Main Outcome Measures:** Vaginal lipids concentration and its correlation with vulvovaginal candidiasis and cytolytic vaginosis. **Results.** PCA, PLS-DA and hierarchical clustering analyses indicated 38 potential lipid biomarkers for the different groups, correlating with oxidative stress, inflammation, apoptosis and integrity of the vaginal epithelial tissue. Among these, greater concentrations were found for Glycochenodeoxycholic acid-7-sulfate, O-adipoylcarnitine, 1-eicosyl-2-heptadecanoyl-glycero-3-phosphoserine, undecanoic acid, formyl dodecanoate and lipoic acid in the vulvovaginal candidiasis group; N-(tetradecanoyl)-sphinganine, DL-PPMP, 1-oleoyl-cyclic phosphatidic, palmitic acid and 5-aminopentanoic acid in the cytolytic vaginosis group; and 1-nonadecanoyl-glycero-3-phosphate, eicosadienoic acid, 1-stearoyl-cyclic-phosphatidic acid, 1-(9Z,12Z-heptadecadienyl)-glycero-3-phosphate, formyl 9Z-tetradecenoate and 7Z,10Z-hexadecadienoic acid in the control group. **Conclusions:** Lipids related to oxidative stress and apoptosis were found in higher concentrations in women with vulvovaginal candidiasis and cytolytic vaginosis, while lipids related to epithelial tissue integrity were more pronounced in the control group. Furthermore, in women with cytolytic vaginosis, we observed higher concentrations of lipids related to bacterial overgrowth.

Keywords	Vaginal discharge; vulvovaginal candidiasis, cytolytic vaginosis, lipidomics; mass spectrometry.
Taxonomy	Candida Infection, Vaginal Wall, Gynecology, Vaginal Diseases, Mass Spectrometry, Lipidomics
Manuscript category	Omics: proteomics, metabolomics, genomics, qualitative and quantitative
Corresponding Author	José Marcos Sanches
Order of Authors	José Marcos Sanches, Paulo César Giraldo, Rose Amaral, Marcos Nogueira Eberlin, Lygia Azevedo Marques, Isabel Migliorini, Marcel Nakahira, Michel Bieleveld, Michelle Garcia Discacciati
Suggested reviewers	Cristina Laguna, Steven Witkin, Adriana Orcesi

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

Cover letter.docx [Cover Letter]

Vaginal lipidomics of women with VVC and CV.docx [Manuscript File]

Conflict of interests.docx [Conflict of Interest]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

Research Data Related to this Submission

There are no linked research data sets for this submission. The following reason is given:
Data will be made available on request

- Successfully received: submission Vaginal lipido... ★

- **Chemico-Biological Interactions** <EvisSupport@elsevier.com> 10:06 PM ★
Para josemarcos.sanches@yahoo.com.br

This message was sent automatically. Please do not reply.

Ref: CHEMBIOINT_2017_918

Title: Vaginal lipidomics of women with vulvovaginal candidiasis and cytolitic vaginosis

Journal: Chemico-Biological Interactions

Dear Mr. Sanches,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Chemico-Biological Interactions. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at:

http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=CHEMBIOINT and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Chemico-Biological Interactions

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2017 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.

Vaginal lipidomics of women with vulvovaginal candidiasis and cytolitic vaginosis

Sanches, J.M.¹, Giraldo, P.C.¹, Amaral, R.¹, Eberlin, M.N.², Marques, L.A.²,
Migliorini, I.¹, Nakahira, M.², Bieleveld, M.J.M.³, Discacciati, M.G.⁴

¹ University of Campinas, Department of Obstetrics and Gynecology, Campinas – São Paulo/Brazil

² Campinas State University, Institute of Chemistry, Campinas – São Paulo/Brazil

³ University of São Paulo, Polytechnic School, São Paulo – São Paulo/Brazil

⁴ University of São Paulo, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo – São Paulo, Brazil

Corresponding author:

José Marcos Sanches

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medical Sciences,
University of Campinas, R. Alexander Fleming, 101, Campinas, SP
13083-891, Brazil

Phone: 55.19.971111-7161

e-mail: josemarcos.sanches@yahoo.com.br

ABSTRACT

Objective: To characterize the lipid profile in vaginal discharge of women with vulvovaginal candidiasis, cytolytic vaginosis, or no vaginal infection or dysbiosis.

Design: Cross-sectional study.

Setting: Genital Infections Ambulatory, Department of Tocogynecology, University of Campinas, Campinas, São Paulo–Brazil.

Sample: Twenty-four women were included in this study: eight with vulvovaginal candidiasis, eight with cytolytic vaginosis and eight with no vaginal infections or dysbiosis (control group).

Methods: The lipid profile in vaginal discharge of the different study groups was determined by liquid chromatography-mass spectrometry and further analyzed with MetaboAnalyst 3.0 platform.

Main Outcome Measures: Vaginal lipids concentration and its correlation with vulvovaginal candidiasis and cytolytic vaginosis.

Results. PCA, PLS-DA and hierarchical clustering analyses indicated 38 potential lipid biomarkers for the different groups, correlating with oxidative stress, inflammation, apoptosis and integrity of the vaginal epithelial tissue. Among these, greater concentrations were found for Glycochenodeoxycholic acid-7-sulfate, O-adipoylcarnitine, 1-eicosyl-2-heptadecanoyl-glycero-3-phosphoserine, undecanoic acid, formyl dodecanoate and lipoic acid in the vulvovaginal candidiasis group; N-(tetradecanoyl)-sphinganine, DL-PPMP, 1-oleoyl-cyclic phosphatidic, palmitic acid and 5-aminopentanoic acid in the cytolytic vaginosis group; and 1-nonadecanoyl-glycero-3-phosphate, eicosadienoic acid, 1-stearoyl-cyclic-phosphatidic acid, 1-(9Z,12Z-heptadecadienoyl)-glycero-3-phosphate, formyl 9Z-tetradecenoate and 7Z,10Z-hexadecadienoic acid in the control group.

Conclusions: Lipids related to oxidative stress and apoptosis were found in higher concentrations in women with vulvovaginal candidiasis and cytolytic vaginosis, while lipids related to epithelial tissue integrity were more pronounced in the control group. Furthermore, in women with cytolytic vaginosis, we observed higher concentrations of lipids related to bacterial overgrowth.

Keywords: Vaginal discharge; vulvovaginal candidiasis, cytolytic vaginosis, lipidomics; mass spectrometry.

INTRODUCTION

The instability surrounding the vaginal ecosystem is a well-known fact in the gynecological practice, and such variations may derive from a variety of

physiological or external factors. The vaginal microbiota is constituted by microorganisms that promote local environmental balance and its maintenance is established by complex interactions between the regular microbiota, the microbial metabolic products, the regular hormonal status and the host's immune response.¹

A high number of women are affected by vulvovaginal diseases such as vulvovaginal candidiasis (VVC) and cytolytic vaginosis (CV). Both conditions present very similar symptomatology and, for this reason, they are commonly mistaken in the clinical practice, leading to misdiagnosis and inappropriate choice of treatment.² Nevertheless, subtle distinctions can be made between them. VVC produces a white and thick vaginal discharge, with vulvovaginal pruritus and eventually pain and vulvovaginal fissure. Its intense inflammatory process results from epithelium aggression caused by a fungus, usually *Candida albicans*.³ On the other hand, CV contains no sort of infection; instead, it is a dysbiosis, consisting of an intense proliferation of lactobacillus that leads to cell lysis, histamine discharge and, ultimately, vaginal epithelial scaling. Rather than pruritus, CV patients often report vulvovaginal burning that is accentuated in the premenstrual period, thus mimicking vulvovaginal candidiasis. Moreover, CV is not accompanied by a cellular inflammatory process as observed in VVC.^{2, 4, 5}

The development of metabolome analysis through mass spectrometry allowed researchers to reach a correct interpretation of the quantitative and qualitative metabolic profile of one organism or biological system, considering the metabolites composition and dynamics with respect to genetic, physiological and environmental factors.^{6, 7} Lipidomics has emerged as a segment closely related to metabolomics and is dedicated to the global study of lipids, including their biochemical characteristics and networks formed within biological systems.⁸⁻¹¹ Nowadays, lipidomics studies are inclined to consider lipids as part of a broad integrated system of pathophysiological processes, instead of individual molecular structures with isolated functions.⁸

The study of lipids composing the vaginal ecosystem is a new and promising perspective for better understanding gynecological conditions and their pathophysiological mechanisms. In this context, the objective of our study was to characterize the lipid profile in vaginal discharge samples of women with

VVC, CV or no infection or dysbiosis, in order to enable improvement of diagnosis and treatment success.

METHODS

Study population and clinical evaluation

A cross-sectional study carried out at the Genital Infections Ambulatory of the Department of Tocogynecology of the University of Campinas included 24 sexually active, non-pregnant women aged 18 to 42 years. Experimental groups were divided and named as follows (n = 8): 1) VVC group: women with vulvovaginal candidiasis; 2) CV group: women with cytolytic vaginosis; 3) NL group: women without any type of vaginal infection or dysbiosis.

The participants were submitted to a specular examination for collection of vaginal samples by Dacron sterile swabs in order to perform lipid analyses and bacterioscopy by Gram stain. The characterization of the VVC group was based on the presence of yeast, pseudohyphae or blastospores in the vaginal discharge by microscopic examination by Gram stain, further confirmed by growth in Sabouraud culture media (Becton-Dickinson, Sparks, MD, USA). The criteria used for the diagnosis of CV included white and flocculated vaginal discharge accompanied by itching and/or burning at clinical evaluation, and Gram stain examination revealing presence of vaginal epithelial cell lysis, high number of *Lactobacillus* morphotypes, absence of leukocytes or microbial pathogens, and negative *Candida* sp culture.

Equivocal cases of endocervicitis, with presence of blood, bacterial vaginosis, trichomoniasis and/or mixed infections were ruled out. Bacterial vaginosis was diagnosed by the Amsel criteria¹² and Nugent score ≥ 7 ¹³. Infection by *Trichomonas vaginalis* was identified by the visualization of inflammatory cells in the vaginal smear by bacterioscopy (Gram stain) and predominance of coccoid and coccobacillary bacteria, as well as the visualization of the protozoan in fresh microscopy.

Lipid analysis of the vaginal samples

Two samples of the vaginal content of each patient were collected using sterile swabs and immediately stored in dry 10-mL tubes at -80°C , until processing.

For extraction of lipids, each sample was resuspended in 1 mL of 1:2 CHCl_3 : MeOH solution (Sigma, Basel, Switzerland), followed by the addition of 0.33 mL of CHCl_3 and 0.33 mL of deionized water. The solution was then stirred for 5 minutes, followed by centrifugation at 13,000 rpm for 5 minutes. The supernatant was discarded, and the bottom layer of the sample containing the lipid fraction was transferred to 1.5-mL tubes. All samples were dried using SpeedVac for 30 minutes at 30°C and kept frozen at -80°C until the date of analysis.

Data Acquisition

Lipid chromatographic separation was performed by ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) Agilent 1290 Infinity system (Agilent, Santa Clara, California, USA) and chromatographic elution was performed on Kinetex C18 column (4.6 mm x 50 mm x 2.6 μm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA). For the positive ion mode, the aqueous mobile phase A solvent was 0.1% formic acid and phase B solvent was methanol; for the negative ion mode, phase A solvent was 5 mM Ammonium Acetate and phase B solvent was methanol. The mobile phase flow rate was 0.3 mL min^{-1} and the injection volume was 2 μL . The mobile phase gradient started at 5% of phase B changing linearly to 95% of phase B within 15 minutes and then returning to the initial composition, at which the gradient was kept constant for 5 minutes until the next run. This gradient profile was used for both positive and negative ion modes.

Mass Spectrometry

To obtain the mass spectra of samples in positive and negative ion modes, a hybrid mass spectrometer with QTOF 6550 mass analyzer (Agilent, Santa Clara, California, USA) was used. The instrumental parameters of the electrospray ionization source used in this study for both positive and negative

ion modes were: VCap of 3,000 V; 100 V shredder voltage, 65 V skimmer voltage, 750 V OCT 1 RF Vpp, 290°C Gas Temperature, 350°C Sheath Gas Temperature, 12 L.min⁻¹ Sheath Gas Flow. The mass spectra were acquired in centroid mode and the mass range used for acquisition was 50-1700 Da.

Data Processing

The raw data obtained was converted to the mzData format using the MassHunter Qualitative software (Agilent, Santa Clara, California, USA), eliminating isotopic interference. After conversion, the files were imported into the XCMS online software¹⁴ for peak detection, alignment, retention time correction and other relevant pre-processing steps.

The data obtained from the online XCMS software was converted into an Excel table. Data normalization, scaling, hierarchical clustering into heatmaps and multivariate statistical analysis were performed in the MetaboAnalyst 3.0 platform.¹⁵ Metabolites with a value of $p < 0.05$ (ANOVA) were considered representative for further investigation. Exploratory multivariate data analysis was performed using the Principal Component Analysis (PCA) unsupervised method and the Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA), allowing selection of molecules with a VIP index higher than 1.0 as potential biomarkers. Putative lipid identification of the selected biomarkers was performed by measurement of their exact mass and elution profile, and further matching of such compounds in METLIN¹⁴, Human Metabolome Database (HMDB)¹⁶ and Lipid Maps databases¹⁷.

RESULTS

PCA and PLS-DA analyses

Comparison between VVC, CV and nl groups with regard to the main lipid components was performed by PCA and PLS-DA analyses (figure 1). Figures 1A and 1B refer to the PCA in positive and negative ion modes, respectively. Both graphs show that the CV ellipses are separated from the other groups, indicating that women with CV manifest a very distinct lipid composition. Larger overlaid area of VVC and nl ellipses in the positive ion mode characterizes a

certain similarity between these groups. In the PLS-DA Parameter Score charts (figures 1C and 1D), separation of the CV group from the VVC and nl groups was more pronounced when compared to the PCA, and this difference was probably due to the unsupervised nature of the latter method.

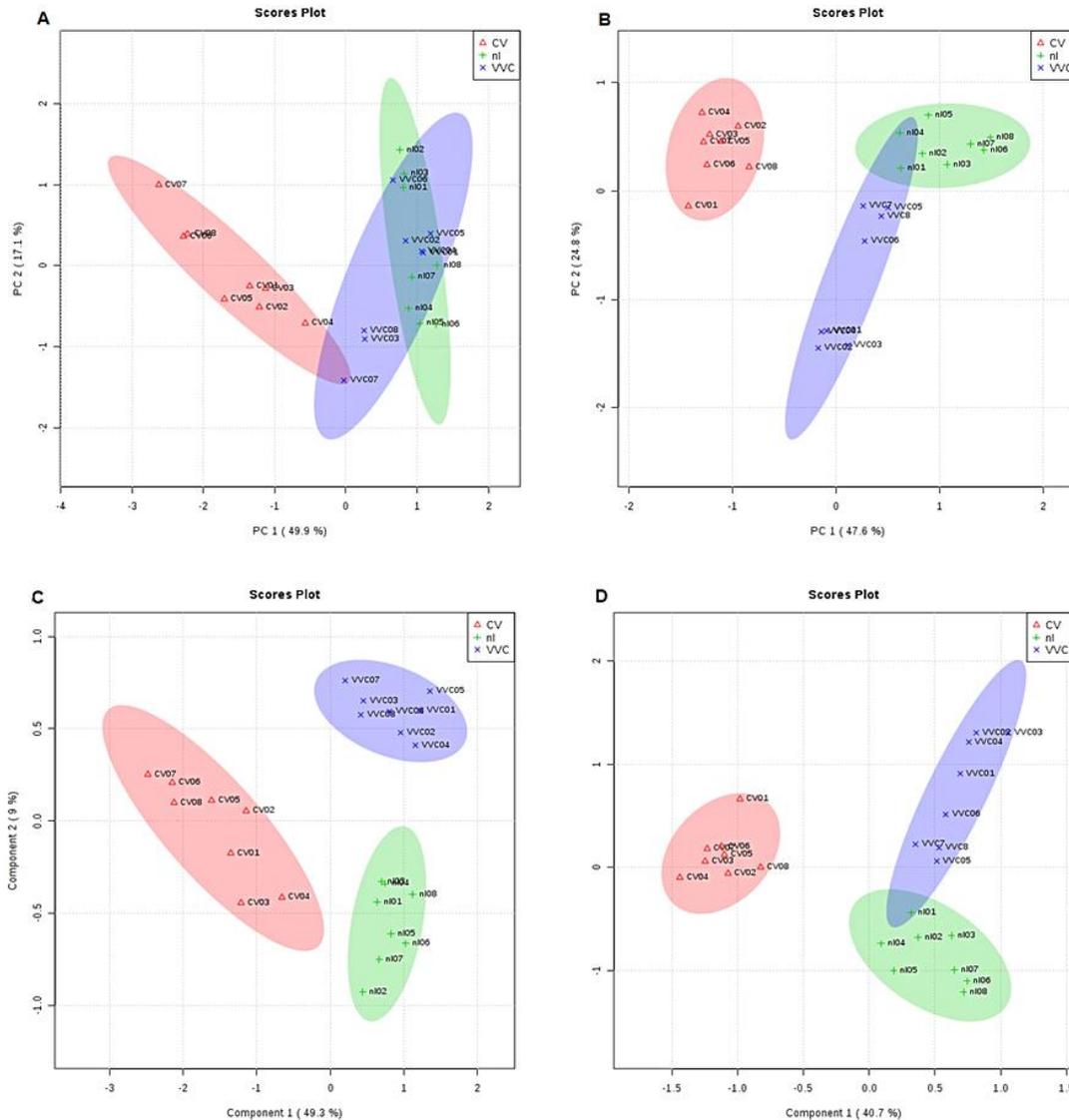


Figure 1. Score Plots analysis of the lipid fraction of vaginal samples from CV (red), nl (green) and VVC (blue) groups. A: PCA analysis in the positive ion mode. B: PCA analysis in the negative ion mode. C: PLS-DA analysis in the positive ion mode. D: PLS-DA analysis in the negative ion mode.

The PLS-DA model also provides the VIP score, which is a measure of a variable's importance in the analysis. Figures 2 and 3 show the lipids with the highest VIP scores and their respective concentrations in the vaginal samples.

As these molecules were the most contributory in the model, they were selected as potential biomarkers for the different experimental groups.

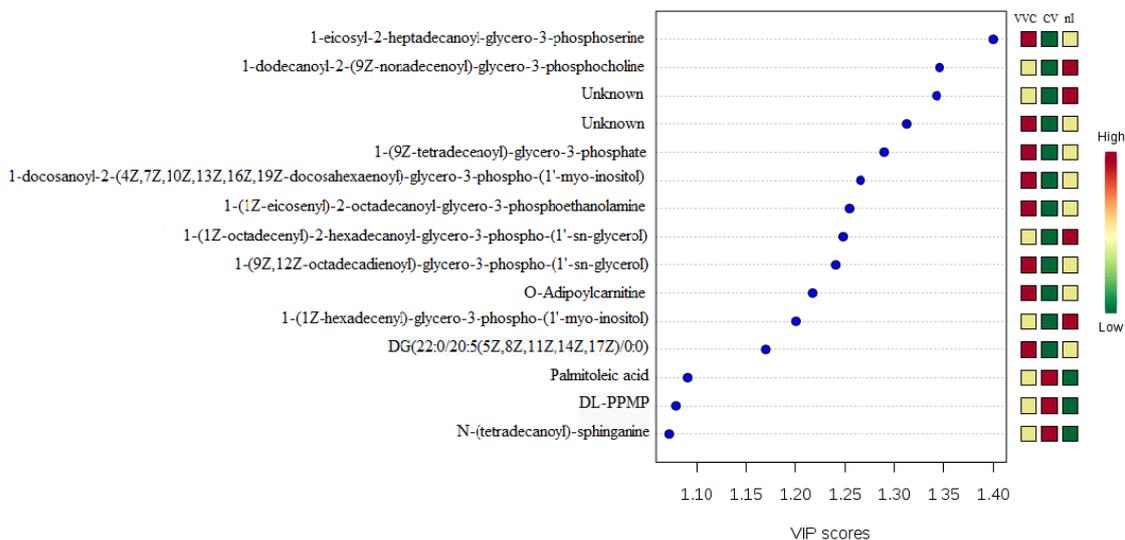


Figure 2. PLS-DA analysis in the positive ion mode revealing the 15 lipid molecules with the highest VIP scores and their respective concentrations in the vaginal samples from CV, nl and VVC groups.

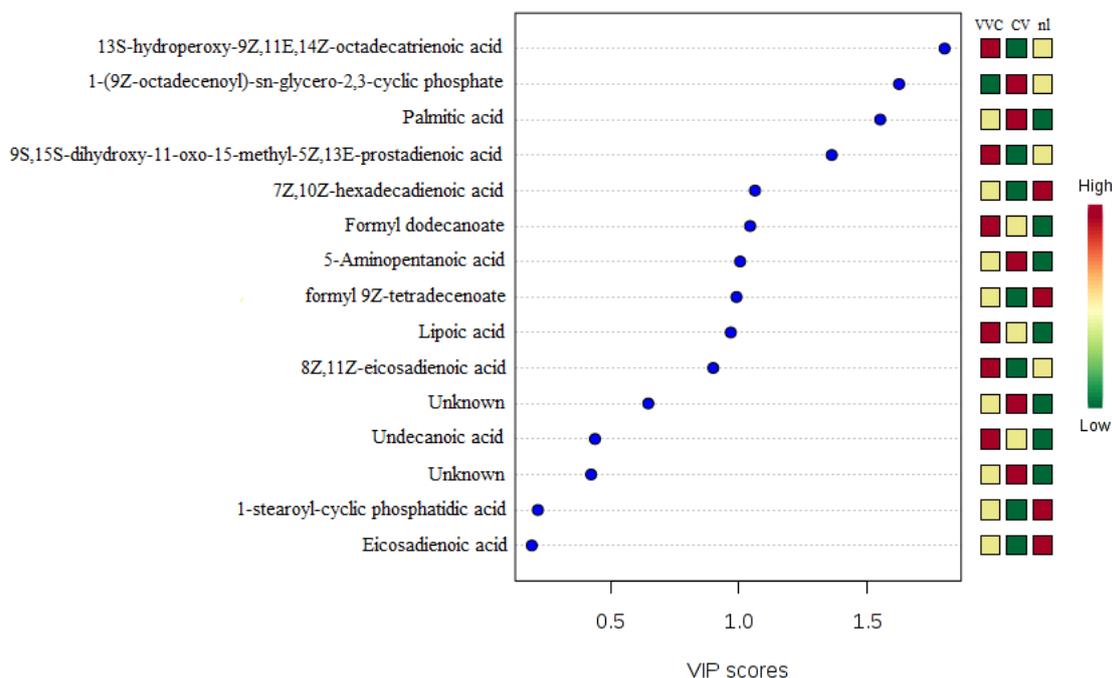


Figure 3. PLS-DA analysis in the negative ion mode revealing the 15 lipid molecules with the highest VIP scores and their respective concentrations in the vaginal samples from CV, nl and VVC groups.

Hierarchical clustering of lipids concentration by sample

Figure 4 shows the hierarchical clustering of lipids in the form of heatmaps and dendrograms, demonstrating the proportion of significantly altered lipid components, identified as potential lipid biomarkers of the studied groups. Results from this analysis confirmed some of the lipid proportions already evidenced by the former methods, as described below.

In VVC women, there was a higher concentration of Glycochenodeoxycholic acid 7-sulfate, 1-(1Z-eicosenyl)-2-octadecanoyl-glycero-3-phosphoethanolamine, O-adipoylcarnitine, 1-eicosyl-2-heptadecanoyl-glycero-3-phosphoserine in comparison with the control and CV groups. On the other hand, CV women showed higher concentrations of N – (tetradecanoyl) sphinganine, DL-PPMP and 1-(11Z-docosenoyl)-glycero-3-phosphate in relation to the other groups. The main potential lipid biomarkers of the control group (nl) were identified as 1-nonadecanoyl-glycero-3-phosphate and 1-(9Z, 12Z-octadecadienoyl)-glycero-3-phospho-(1'-sn-glycerol). Several lipids presented similar concentrations especially between the VVC and nl groups, thus corroborating the overlapping ellipses found in the PCA and PLS-DA analyses.

Moreover, the negative ionization mode showed the highest contrasts of lipid concentrations for VVC and CV groups. In this sense, the most expressive lipid biomarkers were undecanoic acid, formyl dodecanoate and lipoic acid for the VVC group, and 1-oleoyl-cyclic phosphatidic, palmitic acid and 5-aminopentanoic acid for the CV group. In parallel, eicosadienoic acid, 1-stearoyl-cyclic-phosphatidic acid, 1-(9Z,12Z-heptadecadienoyl)-glycero-3-phosphate, formyl 9Z-tetradecenoate and 7Z,10Z-hexadecadienoic acid were the main potential biomarkers for the control group.

Considering all methods of analysis, in both negative and positive ion modes, we found 38 potential biomarkers that allow distinction between the VVC, CV and control groups.

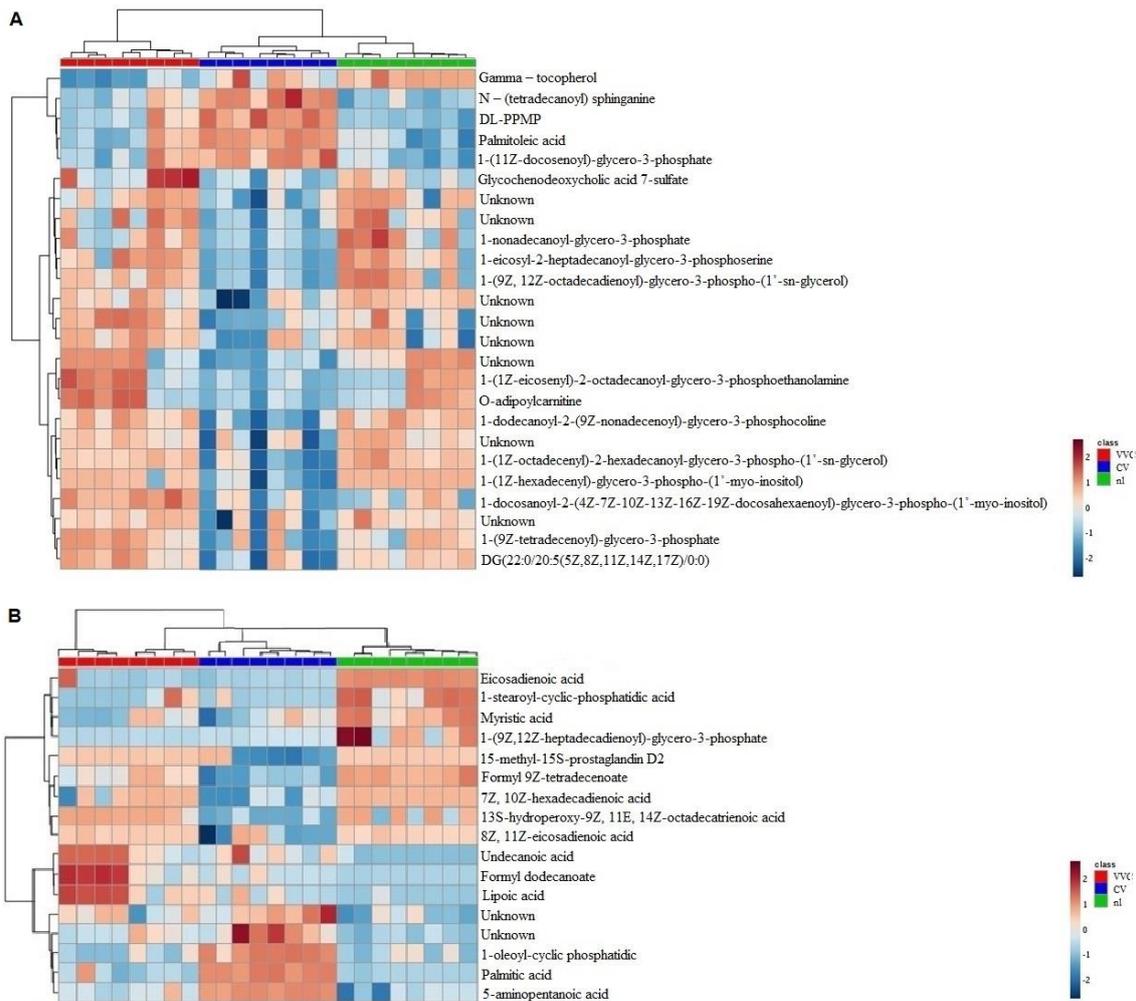


Figure 4. Hierarchical clustering of lipids with regard to their relative concentration in each vaginal sample from VVC (red dendrogram columns), CV (blue dendrogram columns) and nl (green dendrogram columns) groups (n = 8). High concentrations of lipids are shown in shades of red and low concentrations are shown in shades of blue. A: analysis performed in the positive ion mode. B: analysis performed in the negative ion mode.

DISCUSSION

Our lipidomics study showed significant differences between women with VVC and CV regarding the lipid composition of vaginal discharge samples. Herein, we showed that lipids play an important role in the maintenance of the vaginal microenvironment homeostasis and that lipids profile can be markedly altered during pathophysiological processes. To our knowledge, this phenomenon had not yet been described in the current literature.

In the present report, lipid biomarkers such as the phosphatidylserines fatty acids phosphatidylinositol and phosphatidylglycerophosphate, involved in cell signaling such as apoptosis, signal transduction of the plasmatic membrane and cardiolipin precursors^{35, 46}, showed higher concentrations in the VVC group.

Moreover, several VVC potential lipid biomarkers were possibly related to inflammation. Among them, we found high concentrations of O-Adipoylcarnitine, belonging to the family of Acyl carnitines, which are intermediate oxidative metabolites synthesized by the mitochondria and peroxisomes, with the objective of transporting long-chain fatty acids for the process of β -oxidation.^{18, 19} Long-chain fatty acids can persistently modify biological processes, such as cellular stress²⁰, ionic variations²¹ and inflammation²². Another lipid biomarker found in the VVC group, the 15-methyl-15S-prostaglandin D2 may act as a mediator of inflammation resulting from the vaginal mucosa response to the virulence factor of *Candida* sp.

Studies have shown that the oxidation of fatty acids typically occurs in tissues submitted to oxidative stress, including sites of inflammation.^{23, 24} Indeed, in the present investigation, a number of the selected biomarkers were found to be potentially related to oxidative stress. 13S-hydroperoxide-9Z,11E,14Z-octadecatrienoic acid, pointed in our study as the lipid biomarker with the highest VIP score in women with VVC (negative ion mode data), is typically produced by lipid peroxidation and can accumulate in mitochondrial membranes, enabling mitochondrial degradation and cellular damage.²⁵⁻²⁷ Consistently, the glycochenodeoxycholic-acid-7-sulfate is the smallest of fatty acids metabolites whose excretion is increased when there are errors in mitochondrial metabolism, being suitable to diagnose mitochondrial beta-oxidation disorders.^{28, 29} In our study, this compound was found in considerable proportions in the vaginal discharge of women with VVC and could be associated with mitochondrial deregulations in response to the oxidative stress caused by *Candida* sp.

A possible biological mechanism against oxidative stress is the production of antioxidant metabolites, such as the lipoic acid.^{30, 31} In its reduced form, dihydrolipoic acid, such compound has been described as a metabolite of fundamental importance to counterbalance reactive oxygen species.³²⁻³⁴ In our

study, lipoic acid was found as a potential biomarker of VVC, also possibly related to the vaginal mucosa response against *Candida* sp. oxidative stress.

Likewise, undecanoic acid was found at higher concentrations in the VVC group and seems to present antifungal and oxidative stress defense properties. This compound is an endogenous fatty acid commonly found in body fluids, and is involved in cell signaling, integrity and stability of biological membranes.³⁵ Studies have shown that the administration of undecanoic acid together with palmitic acid has resulted in antifungal activity³⁶ and inhibition of the morphogenesis of *Candida albicans*, preventing the development of blastospores into hyphae.³⁷ Thus, the presence of this lipid in women with VVC indicates a tissue response to *Candida* sp. infection.

Interestingly, palmitic acid was found at high concentrations only in the CV group. This compound is the most prominent fatty acid used by the human body.³⁸ Studies with rats have shown that palmitic acid increases endoplasmic reticulum stress, apoptosis in endothelial cells³⁹, increases endothelial nitric oxide synthase phosphorylation⁴⁰ and increases the formation of ROS and NADPH oxidase in skeletal muscles⁴¹. Therefore, CV lipid profile was also influenced by oxidative stress, probably caused by the exacerbated increase of lactobacilli producing lactic acid and other organic acids.

N-(tetradecanoyl) sphinganine and DL-threo-1-phenyl-2-palmitoylamino-3-morpholino-1-propanol (DL-PPMP) were also indicated as potential biomarkers for CV in our study. Both are precursors of apoptosis⁴²⁻⁴⁴, possibly due to the homeostatic disturbance related to the low pH (3.5 to 4.5) that is characteristic of this vaginosis⁵. Additionally, the increase in the levels of palmitoleic acid and 1-oleoyl-cyclic phosphatidic acid in the CV group was consistent with the role of these acids on injured epithelial tissues.⁴⁵

The 5-aminopentanoic acid can be produced endogenously or by the bacterial catabolism of lysine, and it is known to act on the growth of anaerobic bacteria.^{47, 48} In contrast, the presence of this biomarker in high concentrations in the CV group, where there is predominance of lactobacilli, raises new questions about the function of this compound in situations where there is an overpopulation of aerobic bacteria.

Among the main lipids identified in the control group (nl), the eicosadienoic acid presented relevant concentrations in comparison to the other

study groups. This compound is an omega-6 fatty acid whose synthesis is linked to several receptors that can be found in various tissues of the human body.^{35, 49, 50} The eicosadienoic acid is an antagonist of the leukotriene B₄ receptor⁵¹, and both leukotrienes and prostanoids act in the body in autocrine and paracrine regulation, influencing many physiological and pathophysiological mechanisms within the cell⁵². This organic acid can be related to anti-inflammatory mechanisms exerting a protective control of inflammatory mediators.⁵³ In addition, the presence of glycerophospholipids as potential biomarkers in the control group supports the function normality of the vaginal epithelial tissue, as these lipids are commonly found in the human organism.^{35, 54}

Furthermore, tocopherols are lipids associated with the cell membranes, acting against the most reactive forms of free radicals, besides preventing lipid peroxidation and bacterial translocation, hence reducing tissue injuries.⁵⁵⁻⁵⁸ Our study demonstrated a higher concentration of gamma-tocopherol in the control group, which is a derivative of vitamin E. Notably, this lipid is important for the vaginal epithelial tissue homeostasis as it acts as a protector against disorders in the local microenvironment, such as the oxidative stress caused by infections and dysbioses. Another antioxidant lipid biomarker found in the control group was myristic acid, which has been described as improving the bioavailability of polar antioxidant molecules in the organism⁵⁹, besides exerting antimicrobial activities⁶⁰.

CONCLUSION

From the lipidomic point of view, we are facing three distinguishable vaginal profiles. In women with VVC, we found a higher concentration of lipids related to inflammation and oxidative stress, while in CV women, we observed a higher concentration of lipids related to cellular apoptosis, oxidative stress and bacterial overgrowth. In control women, vaginal lipidoma was characterized by the presence of lipids involved in the maintenance of epithelial integrity epithelium and anti-inflammatory and antioxidant functions.

For clinical practice, this work provides some answers and new insights about the lipid metabolism involved in the pathophysiological processes of VVC

and CV. Our results provide subsidies for better definition of conduct and treatment for women affected by these so frequent gynecological disorders.

Disclosure of interests: None of the authors have a conflict of interest to declare.

Contribution to authorship: JMS, PCG, MGD, performed and analyzed all of the clinical data, and contributed to data analysis and writing the article. JMS performed the actual laboratory analysis. LMA, IFM, MN, MJMB collaborated with the lipidomics sample preparation and data data acquisition. RA obtained the vaginal samples. MNE made this study viable through the partnership with the Thomson Mass Spectrometry Laboratory and collaborated with the review of the lipidomics data analysis and the article.

Details of ethics approval: The study was approved by the Ethics and Research Committee at the University of Campinas, CAAE n° 60648016.8.0000.5404, and written informed consent was obtained from all participants.

Funding: Research Support Foundation of Sao Paulo (FAPESP), project n°2016/18850-9.

Acknowledgements: The supervision of the laboratory studies by Gustavo Henrique Bueno Duarte at Thomson Mass Spectrometry Laboratory – Campinas State University.

REFERENCES

1. Giraldo PC, Amaral RLGd, Gonçalves AK, Vicentini R, Martins CH, Giraldo H, et al. Influence of frequency of vaginal intercourse and the use of douching on vaginal microbiota. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2005;**27**(5):257-62.

2. Hu Z, Zhou W, Mu L, Kuang L, Su M, Jiang Y. Identification of cytolytic vaginosis versus vulvovaginal candidiasis. *J Low Genit Tract Dis* 2015;**19**(2):152-5.
3. Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. *Lancet* 2007;**369**(9577):1961-71.
4. Cerikcioglu N, Beksac MS. Cytolytic vaginosis: misdiagnosed as candidal vaginitis. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2004;**12**(1):13-6.
5. Cibley LJ. Cytolytic vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 1991;**165**(4 Pt 2):1245-9.
6. Almstetter MF, Oefner PJ, Dettmer K. Comprehensive two-dimensional gas chromatography in metabolomics. *Anal Bioanal Chem* 2012;**402**(6):1993-2013.
7. Putri SP, Yamamoto S, Tsugawa H, Fukusaki E. Current metabolomics: technological advances. *J Biosci Bioeng* 2013;**116**(1):9-16.
8. Han X, Gross RW. Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics. *J Lipid Res* 2003;**44**(6):1071-9.
9. Lagarde M, Geloën A, Record M, Vance D, Spener F. Lipidomics is emerging. *Biochim Biophys Acta* 2003;**1634**(3):61.
10. Quehenberger O, Dennis EA. The human plasma lipidome. *N Engl J Med* 2011;**365**(19):1812-23.
11. Shevchenko A, Simons K. Lipidomics: coming to grips with lipid diversity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;**11**:593-8.
12. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach D, Holmes KK. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med* 1983;**74**(1):14-22.
13. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol* 1991;**29**(2):297-301.
14. Tautenhahn R, Patti GJ, Rinehart D, Siuzdak G. XCMS Online: a web-based platform to process untargeted metabolomic data. *Anal Chem* 2012;**84**(11):5035-9.
15. Xia J, Sinelnikov IV, Han B, Wishart DS. MetaboAnalyst 3.0--making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Res* 2015;**43**(W1):W251-7.
16. <http://www.hmdb.ca/metabolites>. Accessed on 07/14/2017.
17. <http://www.lipidmaps.org/>. Accessed on 07/14/2017.

18. Reuter SE, Evans AM. Carnitine and acylcarnitines: pharmacokinetic, pharmacological and clinical aspects. *Clin Pharmacokinet* 2012;**51**(9):553-72.
19. Rinaldo P, Matern D, Bennett MJ. Fatty acid oxidation disorders. *Annu Rev Physiol* 2002;**64**:477-502.
20. McCoin CS, Knotts TA, Ono-Moore KD, Oort PJ, Adams SH. Long-chain acylcarnitines activate cell stress and myokine release in C2C12 myotubes: calcium-dependent and -independent effects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2015;**308**(11):E990-e1000.
21. Sato T, Kiyosue T, Arita M. Inhibitory effects of palmitoylcarnitine and lysophosphatidylcholine on the sodium current of cardiac ventricular cells. *Pflugers Arch* 1992;**420**(1):94-100.
22. Rutkowsky JM, Knotts TA, Ono-Moore KD, McCoin CS, Huang S, Schneider D, et al. Acylcarnitines activate proinflammatory signaling pathways. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2014;**306**(12):E1378-87.
23. Yoshida Y, Umeno A, Akazawa Y, Shichiri M, Murotomi K, Horie M. Chemistry of lipid peroxidation products and their use as biomarkers in early detection of diseases. *J Oleo Sci* 2015;**64**(4):347-56.
24. Ramsden CE, Ringel A, Feldstein AE, Taha AY, MacIntosh BA, Hibbeln JR, et al. Lowering dietary linoleic acid reduces bioactive oxidized linoleic acid metabolites in humans. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2012;**87**(4-5):135-41.
25. Mabalirajan U, Rehman R, Ahmad T, Kumar S, Singh S, Leishangthem GD, et al. Linoleic acid metabolite drives severe asthma by causing airway epithelial injury. *Sci Rep* 2013;**3**:1349.
26. Sun D, Funk CD. Disruption of 12/15-lipoxygenase expression in peritoneal macrophages. Enhanced utilization of the 5-lipoxygenase pathway and diminished oxidation of low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1996;**271**(39):24055-62.
27. Kuhn H, Brash AR. Occurrence of lipoxygenase products in membranes of rabbit reticulocytes. Evidence for a role of the reticulocyte lipoxygenase in the maturation of red cells. *J Biol Chem* 1990;**265**(3):1454-8.
28. Liang S, Su WW, Wang YG, Peng W, Nie YC, Li PB. Effect of quercetin 7-rhamnoside on glycochenodeoxycholic acid-induced L-02 human normal liver cell apoptosis. *Int J Mol Med* 2013;**32**(2):323-30.
29. Zhangxue H, Min G, Jinning Z, Yuan S, li W, Huapei S, et al. Glycochenodeoxycholate induces rat alveolar epithelial type II cell death and inhibits surfactant secretion in vitro. *Free Radic Biol Med* 2012;**53**(1):122-8.

30. Chevion S, Hofmann M, Ziegler R, Chevion M, Nawroth PP. The antioxidant properties of thioctic acid: characterization by cyclic voltammetry. *Biochem Mol Biol Int* 1997;**41**(2):317-27.
31. Nagamatsu M, Nickander KK, Schmelzer JD, Raya A, Wittrock DA, Tritschler H, et al. Lipoic acid improves nerve blood flow, reduces oxidative stress, and improves distal nerve conduction in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 1995;**18**(8):1160-7.
32. Tirosh O, Sen CK, Roy S, Kobayashi MS, Packer L. Neuroprotective effects of alpha-lipoic acid and its positively charged amide analogue. *Free Radic Biol Med* 1999;**26**(11-12):1418-26.
33. Borcea V, Nourooz-Zadeh J, Wolff SP, Klevesath M, Hofmann M, Urich H, et al. alpha-Lipoic acid decreases oxidative stress even in diabetic patients with poor glycemic control and albuminuria. *Free Radic Biol Med* 1999;**26**(11-12):1495-500.
34. Ames BN. Micronutrients prevent cancer and delay aging. *Toxicol Lett* 1998;**102-103**:5-18.
35. NELSON DL, COX MM. Princípios de Bioquímica de Lehninger Porto Alegre: Artmed; 2011.
36. Avrahami D, Shai Y. Bestowing antifungal and antibacterial activities by lipophilic acid conjugation to D,L-amino acid-containing antimicrobial peptides: a plausible mode of action. *Biochemistry* 2003;**42**(50):14946-56.
37. McLain N, Ascanio R, Baker C, Strohaber RA, Dolan JW. Undecylenic acid inhibits morphogenesis of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;**44**(10):2873-5.
38. Staiger H, Staiger K, Stefan N, Wahl HG, Machicao F, Kellner M, et al. Palmitate-induced interleukin-6 expression in human coronary artery endothelial cells. *Diabetes* 2004;**53**(12):3209-16.
39. Li X, Gonzalez O, Shen X, Barnhart S, Kramer F, Kanter JE, et al. Endothelial acyl-CoA synthetase 1 is not required for inflammatory and apoptotic effects of a saturated fatty acid-rich environment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;**33**(2):232-40.
40. Lu Y, Cheng J, Chen L, Li C, Chen G, Gui L, et al. Endoplasmic reticulum stress involved in high-fat diet and palmitic acid-induced vascular damages and fenofibrate intervention. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;**458**(1):1-7.
41. Lambertucci RH, Hirabara SM, Silveira Ldos R, Levada-Pires AC, Curi R, Pithon-Curi TC. Palmitate increases superoxide production through mitochondrial electron transport chain and NADPH oxidase activity in skeletal muscle cells. *J Cell Physiol* 2008;**216**(3):796-804.

42. Watters RJ, Fox TE, Tan SF, Shanmugavelandy S, Choby JE, Broeg K, et al. Targeting glucosylceramide synthase synergizes with C6-ceramide nanoliposomes to induce apoptosis in natural killer cell leukemia. *Leuk Lymphoma* 2013;**54**(6):1288-96.
43. Shen W, Henry AG, Paumier KL, Li L, Mou K, Dunlop J, et al. Inhibition of glucosylceramide synthase stimulates autophagy flux in neurons. *J Neurochem* 2014;**129**(5):884-94.
44. Stefanic S, Spycher C, Morf L, Fabrias G, Casas J, Schraner E, et al. Glucosylceramide synthesis inhibition affects cell cycle progression, membrane trafficking, and stage differentiation in *Giardia lamblia*. *J Lipid Res* 2010;**51**(9):2527-45.
45. Zhu Q, Yang J, Zhu R, Jiang X, Li W, He S, et al. Dihydroceramide-desaturase-1-mediated caspase 9 activation through ceramide plays a pivotal role in palmitic acid-induced HepG2 cell apoptosis. *Apoptosis* 2016;**21**(9):1033-44.
46. Alberts, B.; Johnson, A. & Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*. 5th Ed., Artmed, 2010.
47. Fothergill JC, Guest JR. Catabolism of L-lysine by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* 1977;**99**(1):139-55.
48. Syrjanen S, Piironen P, Markkanen H. Free amino-acid content of wax-stimulated human whole saliva as related to periodontal disease. *Arch Oral Biol* 1987;**32**(9):607-10.
49. Kain V, Ingle KA, Kachman M, Baum H, Shanmugam G, Rajasekaran NS, et al. Excess Omega-6 Fatty Acids Influx in Aging Drives Metabolic Dysregulation, Electrocardiographic Alterations and Low-grade Chronic Inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2017:ajpheart.00297.2017.
50. Choi JS, Park NH, Hwang SY, Sohn JH, Kwak I, Cho KK, Choi IS. The antibacterial activity of various saturated and unsaturated fatty acids against several oral pathogens. *Environ Biol* 2013;**34**:673–676.
51. Yagaloff KA, Franco L, Simko B, Burghardt B. Essential fatty acids are antagonists of the leukotriene B4 receptor. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1995;**52**(5):293-7.
52. Smith WL. Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *Am J Physiol* 1992;**263**(2 Pt 2):F181-91.
53. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol* 2008;**8**(5):349-61.

54. Park KA, Vasko MR. Lipid mediators of sensitivity in sensory neurons. *Trends Pharmacol Sci* 2005;**26**(11):571-7.
55. Schanaider A, Castro LS, Madi K. Effects of alpha- tocopherol on bacterial translocation and lipid peroxidation in rats with intestinal obstruction. *Acta Cirúrgica Brasileira* 2003;**18**(4): 283-8.
56. Dairi S, Carbonneau MA, Galeano-Diaz T, Remini H, Dahmoune F, Aoun O, et al. Antioxidant effects of extra virgin olive oil enriched by myrtle phenolic extracts on iron-mediated lipid peroxidation under intestinal conditions model. *Food Chem* 2017;**237**:297-304.
57. Denniss SG, Haffner TD, Kroetsch JT, Davidson SR, Rush JW, Hughson RL. Effect of short-term lycopene supplementation and postprandial dyslipidemia on plasma antioxidants and biomarkers of endothelial health in young, healthy individuals. *Vasc Health Risk Manag* 2008;**4**(1):213-22.
58. Palan PR, Shaban DW, Martino T, Mikhail MS. Lipid-soluble antioxidants and pregnancy: maternal serum levels of coenzyme Q10, alpha-tocopherol and gamma-tocopherol in preeclampsia and normal pregnancy. *Gynecol Obstet Invest* 2004;**58**(1):8-13.
59. Prasadani WC, Senanayake CM, Jayathilaka N, Ekanayake S, Seneviratne KN. Effect of three edible oils on the intestinal absorption of caffeic acid: An in vivo and in vitro study. *PLoS One* 2017;**12**(6):e0179292.
60. Vudhgiri S, Koude D, Veeragoni DK, Misra S, Prasad RBN, Jala RCR. Synthesis and biological evaluation of 5-fatty-acylamido-1, 3, 4-thiadiazole-2-thioglycosides. *Bioorg Med Chem Lett* 2017;**27**(15):3370-3.

5. DISCUSSÃO

As análises do lipidoma vaginal de mulheres com CVV e VC permitiram uma visão mais crítica sobre os processos fisiopatológicos para essas

desordens vaginais, ainda não descritos pela literatura até então. A partir da caracterização dos lipídios presentes no conteúdo vaginal dessas mulheres possibilitou correlacionar os potenciais biomarcadores com os fatores clínico-sintomatológicos, elucidando os mecanismos e vias metabólicas envolvidos na fisiopatogênese da CVV e VC. Contudo, a avaliação dos biomarcadores lipídicos para estas condições, considerando os fatores precursores de inflamação e apoptose se faz importante para esclarecer as respostas da mucosa vaginal frente ao comportamento da *Candida* sp e lactobacilar .

Os avanços em espectrometria de massa e inovações em tecnologias cromatográficas têm impulsionado o desenvolvimento da lipidômica em várias áreas da ciência. O principal significado biológico da lipidômica é o avanço da pesquisa tradicional de lipídios e as relações entre como vincular metabolitos lipídicos e/ou vias metabólicas lipídicas em sistemas biológicos complexos com a saúde metabólica do indivíduo, bem como interpretar as mudanças e regulação no metabolismo lipídico ligadas aos mecanismos de doenças metabólicas e inflamatórias. As investigações lipidômicas se concentram na medição de alterações de lipídios como indicativo de doenças, perturbações ambientais ou resposta à dieta, medicamentos, toxinas e até mesmo a genética (85, 86).

Nosso estudo sobre a lipidômica do conteúdo vaginal de mulheres com CVV e VC pôde mostrar diferenças significativas em relação ao grupo controle no que se remete à composição lipídica nos processos de manutenção da homeostase do ambiente vaginal e possíveis perturbações que caracterizam os processos fisiopatológicos para essas condições.

Em mulheres saudáveis não propensas a candidíase vulvovaginal de recorrência, pode haver a colonização assintomática da *Candida* por meses ou anos, isso devido ao fato de que essas leveduras vivem em simbiose na microbiota vaginal. Na CVV sintomática há um crescimento excessivo deste fungo, desencadeando uma resposta inflamatória na mucosa vaginal. A susceptibilidade para CVV e CV recorrentes podem se relacionar com fatores genéticos, biológicos e/ou comportamentais, tendo o sistema imune inato como uma das primeiras barreiras contra a *Candida*. Os receptores de reconhecimento de células imunes detectam porções moleculares do fungo e

induzem sinais intracelulares nas células epiteliais, estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias e defensinas (87, 88).

Os potenciais biomarcadores lipídicos relacionados à inflamação na CVV, indicados pelas análises de PCA, escore VIP, e em altas concentrações no *heat map* foram os ácidos graxos O-adipoilcarnitina, que é um composto orgânico conhecido como acilcarnitina da classe dos ácidos graxos de éster e subclasse dos acilcarnitinas e também o ácido graxo 15-metil-15S-prostaglandina-D2, da classe dos ácidos graxos eicosanoides e da subclasse das prostaglandinas.

Os acilcarnitinas são metabólitos oxidativos intermediários sintetizados pelas mitocôndrias e peroxissomos, incluindo as enzimas carnitina O-palmitoiltransferase 1 (CPT1) e CPT2 com o objetivo de transportar ácidos graxos de cadeia longa pela membrana mitocondrial para a β -oxidação (89, 90). Os ácidos graxos de cadeia longa podem alterar muitos processos biológicos, tais como causar um estresse na célula (91), variações iônicas (92) e inflamação (93). A partir das informações sobre a fisiologia e fisiopatologia dos ácidos graxos de cadeia longa, tais como os acilcarnitinas, muitas lacunas no conhecimento poderão ser esclarecidas a fim de entender as causas para várias doenças metabólicas (91). O perfil de acilcarnitinas fornece informações sobre possíveis distúrbios metabólicos dos ácidos graxos e tem sido usado para identificação de doenças genéticas. Porém, até onde sabemos, este é o primeiro trabalho a descrever a presença do metabólito O-adipoilcarnitina na amostra vaginal de mulheres com candidíase em concentração maior do que a encontrada em mulheres sem infecção ou com vaginose citolítica. Levando em consideração seu papel no processo inflamatório, este achado é condizente com os que encontramos na análise citológica das lâminas coradas pelo Gram, nas quais observamos a presença de critérios inflamatórios apenas nas mulheres com CVV. Análogos de acilcarnitinas já foram testados como microbicidas tópicos para prevenir infecções genitais, apresentado excelente atividade anti-Candida (94).

Os eicosanoides são produzidos por todos os tipos de células cutâneas e estes contribuem para os processos homeostáticos celulares e também estão relacionados com respostas inflamatórias associadas com lesões teciduais e condições agudas ou crônicas (95, 96). As prostaglandinas

sofrem metabolismo transcelular, sendo este processo importante na mediação de respostas nos sistemas biológicos. As células imunológicas, por exemplo, após receberem um estímulo são induzidas pelos eicosanoides a causar uma resposta inflamatória (97, 98). O biomarcador lipídico 15-metil-15S-prostaglandina-D2, portanto, por ser um mediador de inflamação, pode ser relacionado à resposta da mucosa vaginal aos fatores de virulência da *Candida*, acarretando no processo inflamatório característico da CVV.

O ácido 1-(9Z-tetradecenoil)-glicero-3-fosfato, um biomarcador para CVV, pode estar relacionado com adesão de moléculas ao tecido epitelial vaginal sendo estes ácidos precursores de fosfatidilcolinas que atuam na osmorregulação e integridade de biomembranas (83).

Os lipídios são bastante diversos em seus componentes estruturais, presentes nas membranas biológicas e atuando também no armazenamento de energia. Esses participam de vários processos metabólicos, tais como na homeostase celular. Alguns lipídios podem exercer papéis de mediadores especializados que atuam na sinalização ou regulação de vários eventos dentro da célula. A maioria dos mediadores lipídicos é proveniente de lipídios oxidados, particularmente ácidos graxos poli-insaturados oxidados, livres ou esterificados em fosfolipídios. Os estudos acerca dos lipídios oxidativos colaboram para o entendimento da homeostase celular, bem como sua participação em processos patológicos (99). A peroxidação lipídica pode ocorrer por reações enzimáticas ou não enzimáticas. As enzimas que participam deste processo são as lipoxigenases, ciclooxigenases, dentre vários citocromos como o P450, sendo que nas reações não enzimáticas ocorre por vias que envolvem a formação de radicais livres. Os metabólitos secundários provenientes da peroxidação lipídica se dão pelos processos de iniciação, propagação e término deste processo (100), tendo a atuação destes metabólitos como moléculas de sinalização (101). Estudos já mostraram que os produtos das oxidações do ácido linoleico produzem metabólitos de ácidos 13-hidroxi-octadecanoico, que estão presentes em tecidos submetidos ao estresse oxidativo, incluindo em locais de inflamação (102, 103). O ácido 13S-hidroperóxido-9Z,11E,14Z-octadecatrienoico, apontado como o principal potencial biomarcador lipídico pelo escore VIP na CVV (modo negativo), indica que este ácido é um produto da peroxidação lipídica, que, pelo processo de

síntese deste composto, mediante a altos índices de estresse oxidativo e produção de espécies reativas de oxigênio, pode ocorrer o acúmulo deste ácido nas membranas mitocondriais, tornando-as mais permeáveis e podendo acarretar na degradação da mitocôndria, liberando elementos que podem levar a lesões celulares (104-106).

O ácido 7-glicocenodeoxicólico sulfato é um acil glicina. Acil glicinas são no geral os menores metabólitos dos ácidos graxos, que, normalmente a excreção deste composto é aumentada quando há erros no metabolismo mitocondrial. Em alguns casos a mensuração destes metabólitos em fluídos corporais pode ser usada para o diagnóstico de desordens associadas à beta-oxidação mitocondrial de ácidos graxos (83). Este composto foi indicado em proporções consideráveis para o grupo da candidíase, podendo ser associado às desregulações mitocondriais frente ao estresse oxidativo causado pela *Candida*.

Um possível mecanismo biológico contra o estresse oxidativo pode se dar pela produção de metabólitos que atuarão como antioxidantes. O ácido lipóico é um ácido graxo derivado do ácido octanóico. Há duas formas em que o ácido lipóico é encontrado, nas formas de enantiômeros R e S. O ácido lipóico R é um cofator essencial para quatro complexos enzimáticos mitocondriais (107, 108). Este composto na sua forma reduzida, o ácido diidrolipóico, foi descrito como um metabólito de fundamental importância no combate à espécies reativas de oxigênio (109-111). Tanto os potenciais biomarcadores lipídicos para estresse oxidativo indicados em altas concentrações na CVV, o ácido lipóico foi indicado como um potencial biomarcador da CVV, porém relacionado a uma possível resposta do organismo contra o estresse oxidativo causado pela presença da *Candida* na mucosa vaginal.

O ácido undecanóico é um ácido graxo endógeno encontrado em fluídos corporais com funções que envolvem sinalização celular, integridade e estabilidade de membranas biológicas (83). Este ácido presente no grupo CVV parece estar relacionado com atividades antifúngicas e contra o estresse oxidativo. Estudos mostraram que a utilização do ácido undecanóico, juntamente com o ácido palmítico acarretou em uma atividade antifúngica (112) e inibe a morfogênese da *C. albicans*, impedindo o desenvolvimento de

blastospóros para hifas (113). O ácido 7Z-tetradecenoico é um ácido que pode atuar como inibidor de bactérias aeróbicas e anaeróbicas (114)

Cinco ácidos presentes no tecido mucoso útero-vaginal foram encontrados e caracterizados como os ácidos mais predominantes: ácido palmítico, ácido mirístico, ácido esteárico, ácido oleico e o ácido linoleico (115). O ácido palmítico é o ácido graxo mais proeminente utilizado pelo corpo humano (116). Estudos com ratos já mostraram que o ácido palmítico aumenta o estresse do retículo endoplasmático, apoptose em células endoteliais (117), aumentam a fosforilação de sintase de óxido nítrico endotelial (118) e aumenta a formação de ROS e NADPH oxidase em músculos esquelético (119). Portanto, o ácido palmítico como potencial biomarcador lipídico expresso em concentrações consideráveis apenas na VC pode estar relacionado com o estresse oxidativo, provavelmente causado pelo aumento exacerbado de lactobacilos produtores de ácido láctico e outros ácidos orgânicos, levando as células epiteliais a apoptose. De fato, ao analisarmos as lâminas coradas pelo Gram das mulheres com VC, observamos uma quantidade aumentada de citólise das células epiteliais, quando comparamos com as mulheres com CVV e normais, o que pode evidenciar o papel do ácido palmítico encontrado em maior concentração na VC.

A vaginose citolítica é caracterizada por sintomas muito semelhantes ao da CVV, porém os achados citológicos e microbiológicos são bastante distintos. A citólise intensa de células intermediárias, visualizada ao exame bacterioscópico, ausência de patógenos e processo inflamatório considerável e a superpopulação de lactobacilos podem ser os fatores que acarretam na queimação vaginal, prurido, vermelhidão vaginal e vulvar, dispareunia e disúria (13). O crescimento exacerbado dos lactobacilos no ecossistema vaginal pode se dar pelo ácido-5-aminopentanóico que pode ser produzido endogenamente ou pelo catabolismo bacteriano da lisina, caracterizando o crescimento bacteriano (83), e, conseqüentemente o aumento na produção do ácido láctico e acidez vaginal, acarretando na lise celular. A ceramida N-(tetradecanoil)-esfinganina juntamente com DL-treo-1-fenil-2-palmitoilamino-3-morfolino-1-propanol (DL-PPMP), também potenciais biomarcadores para VC em nosso estudo, são precursores de apoptose (120-122), possivelmente pela

perturbação homeostática relacionada ao baixo pH (3,5 a 4,5) característico na VC.

O ácido fosfatídico cíclico ou ácido lisofosfatídico cíclico é um glicerofosfolípídio que está presentes em tecidos sujeitos a lesões (83). Em resposta ao processo de degradação do tecido epitelial vaginal os níveis de ácido palmitoleico e do ácido fosfatídico-1-oleoil-cíclico foram mais expressos no grupo VC, pois estes ácidos atuam em tecidos lesionados (123). O ácido fosfatídico 1-estearoil-cíclico, também do grupo de ácidos lisofosfatídicos, foi identificado no grupo controle, podendo este estar relacionado a fatores de manutenção da mucosa vaginal. Os lactobacilos são predominantes na microbiota de mulheres em idade reprodutiva e em condições normais. Por meio da produção de ácidos orgânicos e do peróxido de hidrogênio, essas bactérias atuam como inibidoras de bactérias patogênicas, porém o excesso dos LB no ecossistema vaginal acarreta em quadros de ardor vaginal, prurido, dispareunia, disúria e corrimento grumoso e esbranquiçado aderido à parede vaginal. Também conhecida como síndrome do supercrescimento de lactobacilos ou citólise de Doderlein, a vaginose VC é caracterizada pela lise intensa das células epiteliais vaginais (15). De fato, analisando minuciosamente os aspectos clínicos e dos achados citológicos e microbiológicos das pacientes com VC, as queixas referidas pelas mulheres se relacionam com a clínica dessas pacientes, somado à visualização ao microscópio de lactobacilos em grande quantidade e lise celular intensa.

Talvez pelo fato de a VC não ser bem difundida pelos médicos ginecologistas e até mesmo não considerada como uma vulvovaginite por alguns autores, esta condição que afeta muitas mulheres pode ser mal diagnosticada, trazendo desconfortos às pacientes diante de um tratamento inadequado e, conseqüentemente a permanência dos sintomas. Em um estudo com 271 mulheres com queixas vulvovaginais, 29 (10.7%) foram diagnosticadas como sugestivas para candidíase vulvovaginal, mas apenas 16 (5.9%) foram confirmadas para candidíase (124). Portanto, mulheres com corrimento vaginal não diagnosticado, o diagnóstico para VC pode ser considerado. A VC não é tão recorrente como a VB e CVV, porém pode ser confundido com CVV em muitos casos (10).

Os esfingolipídios, glicerofosfolipídios, glicerolipídios e ácidos graxos são essenciais para organismos eucariotos. A partir da compreensão das vias metabólicas que os lipídios atuam, a nível celular ou sistêmico, é possível interpretar por que os lipídios podem alterar suas estruturas moleculares e/ou concentração após uma perturbação fisiológica ou externa (125). Os glicerolipídeos compõem uma classe de lipídios relativamente simples, que incluem os monoacilglicerois (MGs), diacilglicerois (DGs) e triacilglicerois (TGs), sendo os TGs os que ocorrem na natureza como o componente principal das gorduras animais. Além disso, os TGs têm um papel importante no armazenamento de energia para a célula e funcionam como mediador nos processos de metabolismo e doença (126). As fosfatidilserinas, fosfatidilinositol e fosfatidilglicerofosfato são ácidos graxos responsáveis por sinalizações celulares como apoptose, transdução de sinal da membrana plasmática e precursores de cardiolipina (77, 127), respectivamente, apresentaram maiores concentrações no grupo da CVV.

Dentre os principais potenciais biomarcadores identificados no grupo controle (nl) de nosso estudo, o ácido eicosadienóico apresentou concentrações relevantes se comparados com os outros grupos de estudo. O ácido eicosadienóico é um ácido graxo ômega-6 que tem sua síntese ligada a vários receptores encontrados em diversos tecidos do corpo humano (83, 84, 128). Em um estudo sobre os efeitos do ácido eicosadienóico na modulação pró-inflamatória demonstrou que este ácido graxo, precursor do ácido linoleico, podem modular a síntese de mediadores de inflamação, tais como prostaglandina (PGE₂), ciclooxigenase (COX-2) e indutor óxido nítrico sintase (iNOS) (129). O ácido eicosadienóico é um antagonista do receptor de leucotrieno B₄ (128), sendo que, tanto os leucotrienos como os protanóides atuam no organismo de forma autócrina e parácrina, influenciando muitas funções celulares que controlam mecanismos fisiológicos e fisiopatológicos (130). Este ácido orgânico pode estar relacionado em mecanismos anti-inflamatórios, sendo, portanto um possível fator protetor contra inflamações por meio do controle dos mediadores inflamatórios.

Glicerofosfolipídeos são lipídios de membrana os quais estão relacionados a vários processos fisiológicos da célula (127). Os ácidos fosfatídicos 1-(9Z, 12Z-heptadecadienoil)-glicero-3-fosfato¹ e 1-nonadecanoil-

glicero-3-fosfato, bem como o 1-(9Z,12Z-octadecadienoil)-glicero-3-fosfato-(1'-sn-glicerol) apresentaram concentrações consideráveis, indicadas nos Heat maps para o grupo controle (nl). Estes componentes de membrana celular, indicados como biomarcadores, se relacionam com processos de agregação de plaquetas sanguíneas, contração muscular, quimiotaxia, expressão de fibras de estresse, aumentam a sensibilidade dos neurônios em processos inflamatórios, atuam na sinalização celular e outros (83, 131). A presença dos glicerofosfolípidos como biomarcadores lipídicos no grupo nl pode ser sugerida como um fator importante que caracteriza a normalidade do tecido epitelial vaginal.

Os tocoferóis são lipídios que se associam com as membranas celulares e atuam como antioxidantes, reagindo com as formas mais reativas de radicais de oxigênio e outros radicais livres destruindo-os. Esta ação antioxidante promove uma proteção dos ácidos graxos insaturados da oxidação, impedindo o dano oxidativo aos lipídios que compõem as membranas biológicas (127, 132) mostraram que a administração de alfa-tocoferol tem um efeito protetor para a mucosa intestinal, relacionando com prevenção da peroxidação lipídica e translocação bacteriana, reduzindo assim injúrias teciduais. O gama-tocoferol é um derivado da vitamina E, também caracterizado como potencial biomarcador lipídico no grupo de mulheres sem CVV e VC, sendo, portanto um importante lipídio para o tecido epitelial vaginal, pois por meio de sua atuação pode colaborar contra distúrbios no microambiente vaginal, tais como o estresse oxidativo causado pela candidíase e vaginose citolítica. Também atuando como antioxidante, o ácido mirístico, também indicado como biomarcador lipídico para o grupo nl, pode melhorar a biodisponibilidade de moléculas antioxidantes polares no organismo (133) e ainda exercer atividades antimicrobianas (134).

Com base nos resultados do PCA e PLS-DA, bem como da concentração dos principais potenciais biomarcadores representados pelos Heat maps nos três grupos de estudo, podemos perceber que estamos lidando com três situações completamente diferentes do ponto de vista da lipidômica. A caracterização lipídica nos permitiu compreender melhor a candidíase e vaginose citolítica em um ponto de vista não apenas clínico, mas também acerca do metabolismo dos lipídios na fisiopatologia dessas duas condições.

Frente aos resultados apresentados podemos inferir que os lipídios apontados como potenciais biomarcadores no grupo nl, alguns deles podem ser adquiridos por meio de dieta. O ácido eicosadienóico encontrado em óleos de palma e óleos vegetais (127, 135), gama-tocoferol encontrado em óleos vegetais, ovos e germe de trigo (127) e ácido mirístico que está presente em óleos de manteiga, coco, palma e noz-moscada (135), podendo assim ser administrado em quantidade adequada e de acordo com recomendações médicas em pacientes com vulvovaginite por *Candida* e vaginose citolítica, principalmente em casos recorrentes destas condições.

A análise lipidômica por espectrometria de massa foi capaz de fornecer informações inéditas sobre potenciais biomarcadores para a candidíase vulvovaginal e vaginose citolítica. Este estudo traz algumas respostas, mas novos questionamentos e possibilidades para outras pesquisas acerca do metabolismo lipídico envolvido nos processos fisiopatológicos da CVV e VC, colaborando para novos tratamentos e profilaxias por meio dos potenciais biomarcadores para estas condições ginecológicas que afetam muitas mulheres.

6. CONCLUSÕES

A perspectiva inovadora deste estudo acerca do ecossistema vaginal e a interação dos principais lipídios como potenciais biomarcadores da candidíase vulvovaginal e da vaginose citolítica possibilitou melhores entendimentos sobre a fisiopatologia dessas condições, servindo de base para estudos futuros que visem melhores profilaxias, prognósticos e tratamentos, podendo ter impacto na qualidade de vida para as pacientes acometidas.

1. Os principais potenciais biomarcadores lipídicos na candidíase vulvovaginal foram 1-eicosil-2-heptadecanoil-glicero-3-fosfatidilserina, 1-(9Z-tetradecenoil) -glicero-3-fosfato, 1-docosanoil-2-(4Z, 7Z, 10Z, 13Z, 16Z, 19Z-docosa-hexanoil)-glicero-3-fosfo-(1'-mio-inositol), 1-(9Z, 12Z-octadecadienoil)-glicero-3-fosfo-(1'-sn-glicerol), O-Adipoilcarnitina, 13S-hidroperoxi-9Z,11E,14Z-octadecatrienoico, 15-metil-15S-Prostaglandina D2, formil dodecanoato, ácido lipóico, ácido 8Z, 11Z-eicosadienóico e o ácido undecanóico. Na vaginose citolítica os lipídios caracterizados como potenciais biomarcadores foram ácido palmitoleico, DL-PPMP, N-(tetradecanoil)-esfinganina, ácido fosfatídico 1-oleoil-cíclico, 5-aminopentanóico, ácido 7Z-tetradecenóico e no grupo controle (nl) foram 1-dodecanoil-2-(9Z-nonadecenil)-glicero-3-fosfocolina, 1-(1Z-octadecenil)-2-hexadecanoil-glicero-3-fosfo-(1'-sn-glicerol), 1-(1Z-hexadecenil)-glicero-3-fosfato-(1'-mio-inositol), 7Z, 10Z-hexadecadienóico, formil 9Z-tetradecenoato, ácido 1-estearoil-cíclico-fosfatídico, gama-tocoferol, ácido mirístico e ácido eicosadienóico.
2. Dentre os potenciais biomarcadores lipídicos identificados na CVV, VC e nl que apresentaram concentrações mais expressivas e podem ser relacionados aos processos fisiológicos e fisiopatológicos de cada grupo foram de acordo com suas funções:

- O-adipoilcarnitina e 15-metil-15S-Prostaglandina D2 podem estar relacionados com o processo inflamatório na candidíase vulvovaginal;
- Ácido 13S-hidroperóxido-9Z,11E,14Z-octadecatrienóico pode fazer parte de processos de peroxidação lipídica mediante ao estresse oxidativo, bem como o ácido 7-glicocenodeoxicólico sulfato que está relacionado ao estresse oxidativo e desordens na beta-oxidação mitocondrial causado pela *Candida*;
- 1-eicosil-2- Heptadecanoil-glicero-3-Fosfoserina pode estar relacionado com a apoptose na CVV;
- DL-PPMP e N-(tetradecanoil) esfinganina podem estar relacionados com os processos de apoptose na VC;
- O ácido 5-aminopentanóico pode atuar como um cofator para o aumento bacteriano na VC;
- O ácido palmítico pode estar relacionado com o estresse oxidativo na VC;
- O ácido palmitoleico e ácido fosfatídico 1-oleoil-cíclico, biomarcadores da VC, podem atuar no tecido epitelial vaginal lesionado (lise celular);
- Os ácidos lipóicos e undecanóico podem atuar como antioxidantes na CVV;
- O ácido eicosadienóico expresso no grupo controle pode atuar no controle de mediadores inflamatórios;
- Os glicerofosfolípídeos presentes no grupo nl podem ser caracterizados como biomarcadores para este grupo por serem componentes básicos de membranas biológicas e atuarem em processos biológicos fundamentais para a célula, indicando a normalidade da fisiologia celular;
- O gama-tocoferol e o ácido mirístico, biomarcadores no grupo nl, podem atuar como antioxidantes.

7. REFERÊNCIAS

1. Leitich H, Bodner-Adler B, Brunbauer M, Kaider A, Egarter C, Husslein P. Bacterial vaginosis as a risk factor for preterm delivery: a meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;189(1):139-47.
2. Hillier SL, Kiviat NB, Hawes SE, Hasselquist MB, Hanssen PW, Eschenbach DA, et al. Role of bacterial vaginosis-associated microorganisms in endometritis. *Am J Obstet Gynecol.* 1996;175(2):435-41.
3. Wiesenfeld HC, Hillier SL, Krohn MA, Landers DV, Sweet RL. Bacterial vaginosis is a strong predictor of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infection. *Clin Infect Dis.* 2003;36(5):663-8.
4. Boskey ER, Telsch KM, Whaley KJ, Moench TR, Cone RA. Acid production by vaginal flora in vitro is consistent with the rate and extent of vaginal acidification. *Infect Immun.* 1999;67(10):5170-5.
5. Giraldo PC, Amaral RLGd, Gonçalves AK, Vicentini R, Martins CH, Giraldo H, et al. Influência da frequência de coitos vaginais e da prática de duchas higiênicas sobre o equilíbrio da microbiota vaginal
Influence of frequency of vaginal intercourse and the use of douching on vaginal microbiota. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia.* 2005:257-62.
6. Kaewsrichan J, Peeyananjarassri K, Kongprasertkit J. Selection and identification of anaerobic lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006;48(1):75-83.
7. Reid G, Younes JA, Van der Mei HC, Gloor GB, Knight R, Busscher HJ. Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9(1):27-38.
8. Brolazo EM, Simoes JA, Nader ME, Tomas MS, Gregoracci GB, Marconi C. [Prevalence and characterization of vaginal lactobacillus species in women at reproductive age without vulvovaginitis]. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2009;31(4):189-95.
9. Patel DA, Gillespie B, Sobel JD, Leaman D, Nyirjesy P, Weitz MV, et al. Risk factors for recurrent vulvovaginal candidiasis in women receiving maintenance antifungal therapy: results of a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;190(3):644-53.
10. Anupama Suresh AR, Ramesh M. Bhat, and Yashaswi Rai. Cytolytic vaginosis: A review. *Indian J Sex Transm Dis;* 2009. p. 48-50.

11. Sobel JD, Karpas Z, Lorber A. Diagnosing vaginal infections through measurement of biogenic amines by ion mobility spectrometry. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012;163(1):81-4.
12. Wolrath H, Stahlbom B, Hallen A, Forsum U. Trimethylamine and trimethylamine oxide levels in normal women and women with bacterial vaginosis reflect a local metabolism in vaginal secretion as compared to urine. *Apmis.* 2005;113(7-8):513-6.
13. Hu Z, Zhou W, Mu L, Kuang L, Su M, Jiang Y. Identification of cytolytic vaginosis versus vulvovaginal candidiasis. *J Low Genit Tract Dis.* 2015;19(2):152-5.
14. Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. *Lancet.* 2007;369(9577):1961-71.
15. Cerikcioglu N, Beksac MS. Cytolytic vaginosis: misdiagnosed as candidal vaginitis. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2004;12(1):13-6.
16. Cibley LJ. Cytolytic vaginosis. *Am J Obstet Gynecol.* 1991;165(4 Pt 2):1245-9.
17. Shime H, Yabu M, Akazawa T, Kodama K, Matsumoto M, Seya T, et al. Tumor-secreted lactic acid promotes IL-23/IL-17 proinflammatory pathway. *J Immunol.* 2008;180(11):7175-83.
18. O'Hanlon DE, Moench TR, Cone RA. In vaginal fluid, bacteria associated with bacterial vaginosis can be suppressed with lactic acid but not hydrogen peroxide. *BMC Infect Dis.* 2011;11:200.
19. Witkin SS, Alvi S, Bongiovanni AM, Linhares IM, Ledger WJ. Lactic acid stimulates interleukin-23 production by peripheral blood mononuclear cells exposed to bacterial lipopolysaccharide. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2011;61(2):153-8.
20. Anderson MR, Klink K, Cohrssen A. Evaluation of vaginal complaints. *Jama.* 2004;291(11):1368-79.
21. Goncalves B, Ferreira C, Alves CT, Henriques M, Azeredo J, Silva S. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. *Crit Rev Microbiol.* 2016;42(6):905-27.
22. Tamura NK NM, Bonassoli LA, Svidzinski TI. Fatores de virulência de *Candida* spp isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. . *Rev Soc Bras Med Trop* 2007;40:91-3. .
23. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(2):167-93.
24. Barousse MM, Steele C, Dunlap K, Espinosa T, Boikov D, Sobel JD, et al. Growth inhibition of *Candida albicans* by human vaginal epithelial cells. *J Infect Dis.* 2001;184(11):1489-93.

25. Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*. 2005;48(6):365-77.
26. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2012;36(2):288-305.
27. Stehr F, Felk A, Gacser A, Kretschmar M, Mahnss B, Neuber K, et al. Expression analysis of the *Candida albicans* lipase gene family during experimental infections and in patient samples. *FEMS Yeast Res*. 2004;4(4-5):401-8.
28. RUHNKE M. Skin and Mucous Membrane Infections. Washington: ASM Press. 2002. *Candida* and Candidiasis. pp. 307-25 p.
29. Prigneau O, Porta A, Poudrier JA, Colonna-Romano S, Noel T, Maresca B. Genes involved in beta-oxidation, energy metabolism and glyoxylate cycle are induced by *Candida albicans* during macrophage infection. *Yeast*. 2003;20(8):723-30.
30. Bensen ES, Martin SJ, Li M, Berman J, Davis DA. Transcriptional profiling in *Candida albicans* reveals new adaptive responses to extracellular pH and functions for Rim101p. *Mol Microbiol*. 2004;54(5):1335-51.
31. Jacobsen ID, Wilson D, Wachtler B, Brunke S, Naglik JR, Hube B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2012;10(1):85-93.
32. Aroutcheva A, Gariti D, Simon M, Shott S, Faro J, Simoes JA, et al. Defense factors of vaginal lactobacilli. *Am J Obstet Gynecol*. 2001;185(2):375-9.
33. Valore EV, Park CH, Igreti SL, Ganz T. Antimicrobial components of vaginal fluid. *Am J Obstet Gynecol*. 2002;187(3):561-8.
34. Yeoman CJ, Thomas SM, Miller ME, Ulanov AV, Torralba M, Lucas S, et al. A multi-omic systems-based approach reveals metabolic markers of bacterial vaginosis and insight into the disease. *PLoS One*. 2013;8(2):e56111.
35. Al-Mushrif S, Eley A, Jones BM. Inhibition of chemotaxis by organic acids from anaerobes may prevent a purulent response in bacterial vaginosis. *J Med Microbiol*. 2000;49(11):1023-30.
36. Vitali B, Cruciani F, Picone G, Parolin C, Donders G, Laghi L. Vaginal microbiome and metabolome highlight specific signatures of bacterial vaginosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34(12):2367-76.
37. Spear GT, French AL, Gilbert D, Zariffard MR, Mirmonsef P, Sullivan TH, et al. Human alpha-amylase present in lower-genital-tract mucosal fluid processes glycogen to support vaginal colonization by *Lactobacillus*. *J Infect Dis*. 2014;210(7):1019-28.

38. Thoma ME, Klebanoff MA, Rovner AJ, Nansel TR, Neggers Y, Andrews WW, et al. Bacterial vaginosis is associated with variation in dietary indices. *J Nutr.* 2011;141(9):1698-704.
39. Vigetti D, Karousou E, Viola M, Deleonibus S, De Luca G, Passi A. Hyaluronan: biosynthesis and signaling. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840(8):2452-9.
40. Imai K, Yamada K, Tamura M, Ochiai K, Okamoto T. Reactivation of latent HIV-1 by a wide variety of butyric acid-producing bacteria. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69(15):2583-92.
41. Wilson K, & Walker, J. *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology* . : Cambridge: Cambridge University Press.; 2010.
42. Watson JT, Sparkman OD. Introduction to Mass spectrometry. Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation. 4^a Ed. ed: Hoboken; 2008.
43. & JW, Sons G, J. H. *Mass Spectrometry: a Textbook.* 2 Ed. ed: Heidelberg: Springer; 2011.
44. Hoffman E, Stroobant. V. *Mass spectrometry : principles and applications.* . 2007.
45. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science.* 1989;246(4926):64-71.
46. Wilm M, Mann M. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal Chem.* 1996;68(1):1-8.
47. Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem.* 1988;60(20):2299-301.
48. Olshina MA, Sharon M. *Mass Spectrometry: A Technique of Many Faces.* *Q Rev Biophys.* 2016;49.
49. Baidoo EE, Xiao Y, Dehesh K, Keasling JD. Metabolite profiling of plastidial deoxyxylulose-5-phosphate pathway intermediates by liquid chromatography and mass spectrometry. *Methods Mol Biol.* 2014;1153:57-76.
50. Zhou B, Xiao JF, Tuli L, Ransom HW. LC-MS-based metabolomics. *Mol Biosyst.* 2012;8(2):470-81.
51. Glish GL, McLuckey, S. A., Ridley, T. Y., & Cooks, R. G. A new "hybrid" sector/quadrupole mass spectrometer for mass spectrometry/mass spectrometry . *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics.* 1982;41 (3)(157-177.).
52. Aebersold R, Mann M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature.* 2016;537(7620):347-55.

53. Benesch JL, Ruotolo BT, Simmons DA, Robinson CV. Protein complexes in the gas phase: technology for structural genomics and proteomics. *Chem Rev.* 2007;107(8):3544-67.
54. Domon B, Aebersold R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science.* 2006;312(5771):212-7.
55. Cahill JD, Furlong ET, Burkhardt MR, Kolpin D, Anderson LG. Determination of pharmaceutical compounds in surface- and ground-water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2004;1041(1-2):171-80.
56. Schlichtherle-Cerny H, Affolter M, Cerny C. Hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to electrospray mass spectrometry of small polar compounds in food analysis. *Anal Chem.* 2003;75(10):2349-54.
57. Strege MA. High-performance liquid chromatographic-electrospray ionization mass spectrometric analyses for the integration of natural products with modern high-throughput screening. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1999;725(1):67-78.
58. Hu Q, Noll RJ, Li H, Makarov A, Hardman M, Graham Cooks R. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J Mass Spectrom.* 2005;40(4):430-43.
59. Chernushevich IV, Loboda AV, Thomson BA. An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2001;36(8):849-65.
60. Wang Y, et al. Current state of the art of mass spectrometry-based metabolomics studies – a review focusing on wide coverage, high throughput and easy identification. *RSC Advances.* 2015;5(96):(p. 78728-78737.).
61. Fiehn O, Kopka J, Dormann P, Altmann T, Trethewey RN, Willmitzer L. Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat Biotechnol.* 2000;18(11):1157-61.
62. Yin P, Xu G. Current state-of-the-art of nontargeted metabolomics based on liquid chromatography-mass spectrometry with special emphasis in clinical applications. *J Chromatogr A.* 2014;1374:1-13.
63. Mayers JR, Wu C, Clish CB, Kraft P, Torrence ME, Fiske BP, et al. Elevation of circulating branched-chain amino acids is an early event in human pancreatic adenocarcinoma development. *Nat Med.* 2014;20(10):1193-8.
64. Sreekumar A, Poisson LM, Rajendiran TM, Khan AP, Cao Q, Yu J, et al. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature.* 2009;457(7231):910-4.
65. Wikoff WR, Anfora AT, Liu J, Schultz PG, Lesley SA, Peters EC, et al. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(10):3698-703.

66. Zhao YY, Wu SP, Liu S, Zhang Y, Lin RC. Ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry as a sensitive and powerful technology in lipidomic applications. *Chem Biol Interact.* 2014;220:181-92.
67. Schadt EE, Bjorkegren JL. NEW: network-enabled wisdom in biology, medicine, and health care. *Sci Transl Med.* 2012;4(115):115rv1.
68. Almstetter MF, Oefner PJ, Dettmer K. Comprehensive two-dimensional gas chromatography in metabolomics. *Anal Bioanal Chem.* 2012;402(6):1993-2013.
69. Putri SP, Yamamoto S, Tsugawa H, Fukusaki E. Current metabolomics: technological advances. *J Biosci Bioeng.* 2013;116(1):9-16.
70. G.G., Harrigan RG. *Metabolic Profiling: Its Role in Biomarker Discovery and Gene Function Analysis.* . London: Kluwer Academic Publishers; 2003.
71. Hyotylainen T, Oresic M. Systems biology strategies to study lipidomes in health and disease. *Prog Lipid Res.* 2014;55:43-60.
72. Han X, Gross RW. Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics. *J Lipid Res.* 2003;44(6):1071-9.
73. Lagarde M, Geloën A, Record M, Vance D, Spener F. Lipidomics is emerging. *Biochim Biophys Acta.* 1634. Netherlands2003. p. 61.
74. Quehenberger O, Dennis EA. The human plasma lipidome. *N Engl J Med.* 2011;365(19):1812-23.
75. Shevchenko A, Simons K. Lipidomics: coming to grips with lipid diversity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11. England2010. p. 593-8.
76. Oresic M, Hanninen VA, Vidal-Puig A. Lipidomics: a new window to biomedical frontiers. *Trends Biotechnol.* 2008;26(12):647-52.
77. Alberts, B.; Johnson, A. & Walter, P. *Molecular Biology of the Cell.* 5th Ed., Artmed, 2010.
78. Alberts B, Johnson A LJ, Raff M, Roberts K, Walter, P. *Fundamentos de biologia celular.* . 2ª Ed. ed. Porto Alegre: Artmed; 2006.
79. Carvalho HFeR-P, S. *A Célula.* 3ª Ed ed: Manole, São Paulo; 2013.
80. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol.* 1991;29(2):297-301.
81. Tautenhahn R, Patti GJ, Rinehart D, Siuzdak G. XCMS Online: a web-based platform to process untargeted metabolomic data. *Anal Chem.* 2012;84(11):5035-9.
82. Xia J, Sinelnikov IV, Han B, Wishart DS. MetaboAnalyst 3.0--making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(W1):W251-7.

83. <http://www.hmdb.ca/metabolites>. Acessado em 14/07/2017. 2017 [
84. <http://www.lipidmaps.org/>. Acessado em 14/07/2017 2017 [
85. Wiest MM, Watkins SM. Biomarker discovery using high-dimensional lipid analysis. *Curr Opin Lipidol*. 2007;18(2):181-6.
86. Han X, Gross RW. Shotgun lipidomics: multidimensional MS analysis of cellular lipidomes. *Expert Rev Proteomics*. 2005;2(2):253-64.
87. Conti HR, Peterson AC, Brane L, Huppler AR, Hernandez-Santos N, Whibley N, et al. Oral-resident natural Th17 cells and gammadelta T cells control opportunistic *Candida albicans* infections. *J Exp Med*. 2014;211(10):2075-84.
88. Pietrella D, Rachini A, Pines M, Pandey N, Mosci P, Bistoni F, et al. Th17 cells and IL-17 in protective immunity to vaginal candidiasis. *PLoS One*. 2011;6(7):e22770.
89. Reuter SE, Evans AM. Carnitine and acylcarnitines: pharmacokinetic, pharmacological and clinical aspects. *Clin Pharmacokinet*. 2012;51(9):553-72.
90. Rinaldo P, Matern D, Bennett MJ. Fatty acid oxidation disorders. *Annu Rev Physiol*. 2002;64:477-502.
91. McCoin CS, Knotts TA, Ono-Moore KD, Oort PJ, Adams SH. Long-chain acylcarnitines activate cell stress and myokine release in C2C12 myotubes: calcium-dependent and -independent effects. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2015;308(11):E990-e1000.
92. Sato T, Kiyosue T, Arita M. Inhibitory effects of palmitoylcarnitine and lysophosphatidylcholine on the sodium current of cardiac ventricular cells. *Pflugers Arch*. 1992;420(1):94-100.
93. Rutkowsky JM, Knotts TA, Ono-Moore KD, McCoin CS, Huang S, Schneider D, et al. Acylcarnitines activate proinflammatory signaling pathways. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014;306(12):E1378-87.
94. Gandour RD. Toward a design of affordable, topical microbicides: acylcarnitine analogues. *Curr Pharm Des*. 2005;11(29):3757-67.
95. Nicolaou A, Pilkington SM, Rhodes LE. Ultraviolet-radiation induced skin inflammation: dissecting the role of bioactive lipids. *Chem Phys Lipids*. 2011;164(6):535-43.
96. Fogh K, Kragballe K. Eicosanoids in inflammatory skin diseases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2000;63(1-2):43-54.
97. Sala A, Folco G, Murphy RC. Transcellular biosynthesis of eicosanoids. *Pharmacol Rep*. 2010;62(3):503-10.
98. Kendall AC, Nicolaou A. Bioactive lipid mediators in skin inflammation and immunity. *Prog Lipid Res*. 2013;52(1):141-64.

99. Anthonymuthu TS, Kim-Campbell N, Bayir H. Oxidative lipidomics: applications in critical care. *Curr Opin Crit Care*. 2017;23(4):251-6.
100. Anthonymuthu TS, Kenny EM, Bayir H. Therapies targeting lipid peroxidation in traumatic brain injury. *Brain Res*. 2016;1640(Pt A):57-76.
101. Dennis EA, Norris PC. Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(8):511-23.
102. Yoshida Y, Umeno A, Akazawa Y, Shichiri M, Murotomi K, Horie M. Chemistry of lipid peroxidation products and their use as biomarkers in early detection of diseases. *J Oleo Sci*. 2015;64(4):347-56.
103. Ramsden CE, Ringel A, Feldstein AE, Taha AY, MacIntosh BA, Hibbeln JR, et al. Lowering dietary linoleic acid reduces bioactive oxidized linoleic acid metabolites in humans. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2012;87(4-5):135-41.
104. Mabalirajan U, Rehman R, Ahmad T, Kumar S, Singh S, Leishangthem GD, et al. Linoleic acid metabolite drives severe asthma by causing airway epithelial injury. *Sci Rep*. 2013;3:1349.
105. Sun D, Funk CD. Disruption of 12/15-lipoxygenase expression in peritoneal macrophages. Enhanced utilization of the 5-lipoxygenase pathway and diminished oxidation of low density lipoprotein. *J Biol Chem*. 1996;271(39):24055-62.
106. Kuhn H, Brash AR. Occurrence of lipoxygenase products in membranes of rabbit reticulocytes. Evidence for a role of the reticulocyte lipoxygenase in the maturation of red cells. *J Biol Chem*. 1990;265(3):1454-8.
107. Chevion S, Hofmann M, Ziegler R, Chevion M, Nawroth PP. The antioxidant properties of thioctic acid: characterization by cyclic voltammetry. *Biochem Mol Biol Int*. 1997;41(2):317-27.
108. Nagamatsu M, Nickander KK, Schmelzer JD, Raya A, Wittrock DA, Tritschler H, et al. Lipoic acid improves nerve blood flow, reduces oxidative stress, and improves distal nerve conduction in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes Care*. 1995;18(8):1160-7.
109. Tirosh O, Sen CK, Roy S, Kobayashi MS, Packer L. Neuroprotective effects of alpha-lipoic acid and its positively charged amide analogue. *Free Radic Biol Med*. 1999;26(11-12):1418-26.
110. Borcea V, Nourooz-Zadeh J, Wolff SP, Klevesath M, Hofmann M, Urich H, et al. alpha-Lipoic acid decreases oxidative stress even in diabetic patients with poor glycemic control and albuminuria. *Free Radic Biol Med*. 1999;26(11-12):1495-500.
111. Ames BN. Micronutrients prevent cancer and delay aging. *Toxicol Lett*. 1998;102-103:5-18.

112. Avrahami D, Shai Y. Bestowing antifungal and antibacterial activities by lipophilic acid conjugation to D,L-amino acid-containing antimicrobial peptides: a plausible mode of action. *Biochemistry*. 2003;42(50):14946-56.
113. McLain N, Ascanio R, Baker C, Strohaber RA, Dolan JW. Undecylenic acid inhibits morphogenesis of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(10):2873-5.
114. Yamashita S, Igarashi M, Hayashi C, Shitara T, Nomoto A, Mizote T, et al. Identification of self-growth-inhibiting compounds lauric acid and 7-(Z)-tetradecenoic acid from *Helicobacter pylori*. *Microbiology*. 2015;161(6):1231-9.
115. Huang A, Isobe N, Obitsu T, Yoshimura Y. Expression of lipases and lipid receptors in sperm storage tubules and possible role of fatty acids in sperm survival in the hen oviduct. *Theriogenology*. 2016;85(7):1334-42.
116. Staiger H, Staiger K, Stefan N, Wahl HG, Machicao F, Kellerer M, et al. Palmitate-induced interleukin-6 expression in human coronary artery endothelial cells. *Diabetes*. 2004;53(12):3209-16.
117. Li X, Gonzalez O, Shen X, Barnhart S, Kramer F, Kanter JE, et al. Endothelial acyl-CoA synthetase 1 is not required for inflammatory and apoptotic effects of a saturated fatty acid-rich environment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(2):232-40.
118. Lu Y, Cheng J, Chen L, Li C, Chen G, Gui L, et al. Endoplasmic reticulum stress involved in high-fat diet and palmitic acid-induced vascular damages and fenofibrate intervention. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;458(1):1-7.
119. Lambertucci RH, Hirabara SM, Silveira Ldos R, Levada-Pires AC, Curi R, Pithon-Curi TC. Palmitate increases superoxide production through mitochondrial electron transport chain and NADPH oxidase activity in skeletal muscle cells. *J Cell Physiol*. 2008;216(3):796-804.
120. Watters RJ, Fox TE, Tan SF, Shanmugavelandy S, Choby JE, Broeg K, et al. Targeting glucosylceramide synthase synergizes with C6-ceramide nanoliposomes to induce apoptosis in natural killer cell leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2013;54(6):1288-96.
121. Shen W, Henry AG, Paumier KL, Li L, Mou K, Dunlop J, et al. Inhibition of glucosylceramide synthase stimulates autophagy flux in neurons. *J Neurochem*. 2014;129(5):884-94.
122. Stefanic S, Spycher C, Morf L, Fabrias G, Casas J, Schraner E, et al. Glucosylceramide synthesis inhibition affects cell cycle progression, membrane trafficking, and stage differentiation in *Giardia lamblia*. *J Lipid Res*. 2010;51(9):2527-45.
123. Zhu Q, Yang J, Zhu R, Jiang X, Li W, He S, et al. Dihydroceramide-desaturase-1-mediated caspase 9 activation through ceramide plays a pivotal role in palmitic acid-induced HepG2 cell apoptosis. *Apoptosis*. 2016;21(9):1033-44.

124. Cibley LJ, Baldwin D. Diagnosing candidiasis. A new, cost-effective technique. *J Reprod Med.* 1998;43(11):925-8.
125. Griffiths WJ. Tandem mass spectrometry in the study of fatty acids, bile acids, and steroids. *Mass Spectrom Rev.* 2003;22(2):81-152.
126. Han X, Abendschein DR, Kelley JG, Gross RW. Diabetes-induced changes in specific lipid molecular species in rat myocardium. *Biochem J.* 2000;352 Pt 1:79-89.
127. NELSON DL, COX MM. *Princípios de Bioquímica de Lehninger* Porto Alegre: Artmed; 2011.
128. Yagaloff KA, Franco L, Simko B, Burghardt B. Essential fatty acids are antagonists of the leukotriene B4 receptor. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1995;52(5):293-7.
129. Huang YS, Huang WC, Li CW, Chuang LT. Eicosadienoic acid differentially modulates production of pro-inflammatory modulators in murine macrophages. *Mol Cell Biochem.* 2011;358(1-2):85-94.
130. Smith WL. Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *Am J Physiol.* 1992;263(2 Pt 2):F181-91.
131. Park KA, Vasko MR. Lipid mediators of sensitivity in sensory neurons. *Trends Pharmacol Sci.* 2005;26(11):571-7.
132. Schanaider A CL, Madi K . Effects of alpha - tocopherol on bacterial translocation and lipid peroxidation in rats with intestinal obstruction. *Acta Cirúrgica Brasileira* 2003;Vol 18 (4) 283
133. Prasadani WC, Senanayake CM, Jayathilaka N, Ekanayake S, Seneviratne KN. Effect of three edible oils on the intestinal absorption of caffeic acid: An in vivo and in vitro study. *PLoS One.* 2017;12(6):e0179292.
134. Vudhgiri S, Koude D, Veeragoni DK, Misra S, Prasad RBN, Jala RCR. Synthesis and biological evaluation of 5-fatty-acylamido-1, 3, 4-thiadiazole-2-thioglycosides. *Bioorg Med Chem Lett.* 2017;27(15):3370-3.
135. Beare-Rogers J. DA, Holm JV.,. *Lexicon of lipid nutrition (IUPAC Technical Report).* *Pure Appl. Chem.*; 2001. p. pp. 685-744.

8. ANEXOS

ANEXO I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Anexo I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

ANEXO II

Instrumento para coleta de dados

ANEXO III

Instrumento para coleta de dados – Laudo bacterioscópico para determinação e conclusão do esfregaço

ANEXO IV

Biorrepositório

ANEXO V

Parecer consubstanciado do projeto de pesquisa analisado pela Comissão de Pesquisa CAISM/UNICAMP.

ANEXO VI

Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp – Campus Campinas

8.1 - Anexo I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Identificação e quantificação dos ácidos orgânicos presentes no conteúdo vaginal de mulheres com vaginose citolítica, vaginose bacteriana e candidíase vulvovaginal por espectrometria de massas

José Marcos Sanches Jr.

Número do CAAE:

A senhora está convidada a participar como voluntário de um estudo. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos e deveres como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houverem perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Se você não quiser participar ou retirar sua autorização, a qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo.

Justificativa e objetivos:

O equilíbrio do ecossistema vaginal é de fundamental importância para a manutenção dos processos de saúde e doença na fisiologia do trato genital feminino. Uma vez que o ambiente vaginal é afetado por fatores fisiológicos e/ou ambientais, podem ocorrer perturbações deste ambiente ocasionando em possíveis desconfortos para a mulher, como corrimentos, coceira, ardor, dores vaginais e até o desenvolvimento de doenças.

Este projeto procura identificar os ácidos orgânicos presentes no conteúdo vaginal de mulheres com alterações na microbiota vaginal, podendo assim esclarecer possíveis associações entre os ácidos produzidos pelas bactérias presentes na vagina e os processos metabólicos que podem ocasionar doenças.

Pesquisador _____

Participante _____

Procedimentos:

Você **não** deve participar deste estudo se:

- For virgem;
- Estiver grávida;
- Ser portador de malignidades, exceto câncer de pele não- melanoma;
- Ser imunodeprimido devido a doenças tais como AIDS, transplantes ou uso de medicamentos imunossupressores como prednisona, Imuran ou quimioterapia para doenças como o Lúpus Sistêmico;

Participando do estudo você irá:

- Realizar exame especular para análise microbiológica e metabólica do conteúdo vaginal:
 1. Posicionar a paciente na mesa ginecológica;
 2. Introduzir o espéculo na vagina;
 3. Coletar com um cotonete o conteúdo vaginal;
 4. Analisar o conteúdo vaginal.

Desconfortos e riscos:

Para a realização de o exame especular, o médico responsável irá introduzir o espéculo na vagina para visualizar a parede vaginal e o colo do útero e coletar o material para o exame microbiológico. O espéculo pode ser de plástico ou metal. Se for de metal, você pode sentir muito frio; se preferir peça ao médico para aquecê-lo em água morna, vai ficar mais confortável.

Quando começar o exame, você vai sentir o espéculo e as mãos do médico na área da vulva (parte externa) e da vagina. Pode ser desconfortável quando o espéculo entrar, mas não deve doer. Você vai sentir como se empurrassem alguma coisa por dentro. Tente relaxar e não se esqueça de respirar. Se não relaxar, seus músculos vão ficar tensos e o exame vai incomodar.

De modo geral, o exame especular vaginal não causa grandes desconfortos e é um procedimento de rotina nos ambulatórios de ginecologia, porém, se você sentir dor ou desconforto quando o espéculo estiver dentro, avise ao médico, ele poderá acomodá-lo para você ficar melhor.

Pesquisador _____ Participante _____

Benefícios:

Além de a senhora estar realizando os exames de rotina para as queixas que foram relatadas ao médico, iremos fazer um estudo mais específico sobre os mecanismos que podem estar envolvidos e que levam ao desconforto que a senhora está sentindo no momento, podendo assim colaborar para a pesquisa e novas perspectivas no entendimento dos desequilíbrios na vagina.

Acompanhamento e assistência:

A senhora está sendo acompanhada pela equipe do Ambulatório de Infecções Genitais I do CAISM onde será avaliada sua queixa e será proposto um tratamento adequando de acordo com os resultados dos exames. No ato da coleta de rotina, iremos apenas coletar uma amostra a mais para realizar o estudo do metabolismo do conteúdo vaginal, não alterando a avaliação médica, acompanhamento e assistência. O seu retorno no ambulatório, caso necessário, será feito exclusivamente pelo médico responsável pela sua consulta no dia.

Sigilo e privacidade:

As informações desta pesquisa serão estritamente confidenciais e apenas as pessoas relacionadas ao estudo terão acesso às anotações médicas realizadas no seu prontuário. O médico ou enfermeiro responsável por seu atendimento lhe fornecerá todas as informações e esclarecimentos em relação às condutas. A sua participação no estudo será voluntária, assim a senhora tem o direito de não aceitar a participar deste estudo, sem comprometimento de seu atendimento ou qualquer penalidade. A senhora poderá se retirar do estudo a qualquer momento que desejar. Caso aceite participar, não haverá pagamento para participação no estudo. A pesquisa ocorrerá dentro da prestação assistencial.

Ressarcimento:

Não há ressarcimento para este estudo, pois iremos inserir mulheres que já são pacientes no Ambulatório de Infecções Genitais – CAISM/UNICAMP.

Pesquisador _____ Participante _____

Armazenamento de material:

O armazenamento de material biológico traz como perspectiva a continuidade do estudo e até mesmo possibilitar novas fontes de informações a partir do material coletado e armazenado. Caso você opte pela autorização do armazenamento do material biológico coletado para reuso nesta e outras pesquisas, você estará colaborando para o meio científico e outros estudos na área biomédica.

Este material armazenado só poderá ser reutilizado mediante a uma nova aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

() concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.

() concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

Contato:

Em caso de dúvidas sobre o estudo, você poderá entrar em contato com José Marcos Sanches Jr. Departamento de Tocoginecologia - Faculdade de Ciências Médicas - Universidade de Campinas – UNICAMP, e-mail: josemarcos.sanches@yahoo.com.br, Tel: (19) 3521-9306 – Ramal: 87430 e Cel: (18) 99679-7161.

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação no estudo, você pode entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP): Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936; fax (19) 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br

Pesquisador _____ Participante _____

Consentimento livre e esclarecido:

Após ter sido esclarecimento sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar:

Nome do(a) participante:

_____ Data: ____/____/____.

(Assinatura do participante ou nome e assinatura do responsável)

Responsabilidade do Pesquisador:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma cópia deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado e pela CONEP, quando pertinente. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

_____ Data: ____/____/____

(Assinatura do pesquisador)

Pesquisador _____ Participante _____

8.2 - Anexo II – Instrumento para coleta de dados

1) IDENTIFICAÇÃO:

1.1- Qual sua data de nascimento? ____/____/____ IDADE: ____

1.2- Cor da pele: [1] Branca [2] Parda [3] Negra [4] Amarela [5] Outra

1.3- Nos últimos 6 meses você está:

[1] com parceiro fixo [2] com parceiro(s) eventual(ais) [3] sem parceiro

1.4- A sra estudou até qual série na escola? _____.

Isto corresponde a quantos anos completos de estudo? _____.

2) ANTECEDENTES:

2.1- Data do início da sua última menstruação: ____/____/____

2.2- Qual método para evitar gravidez a Sra. usou nos últimos seis meses?
_____ (especificar).

2.3- Quantas vezes a Sra. ficou grávida? _____

2.4- Quantos partos a Sra. teve? _____

2.5- Quantos abortos a Sra. teve? _____

2.6- Quantos parceiros sexuais a Sra. teve nos últimos 6 meses? _____

2.7- Quantas relações sexuais vaginais a Sra. tem por mês? _____

2.8- A Sra. é fumante? [1] Sim [2] Não

2.9- A Sra. está com corrimento? [1] Sim [2] Não [3] Não sabe

Se resposta não ou não sabe, passe para ítem 2.14

2.10- Esse corrimento tem cheiro forte? [1] Sim [2] Não

2.12- Tem coceira? [1] Sim [2] Não

2.13- Qual é a quantidade? [1] Pouca [2] Moderada [3] Grande

2.14- A Senhora tem ou teve algum tipo de verruga genital ou alteração no seu exame de Papanicolau sugestivo de HPV confirmada por médico nos últimos 6 meses? [1] Sim [2] Não [3] Não sabe

3) EXAME GINECOLÓGICO:

3.1- VULVA: [1] Normal [2] Alterada

Hiperemia: [1] Presente [2] Ausente

Fissuras: [1] Presente [2] Ausente

Verrugas vulgar: [1] Presente [2] Ausente

Condiloma genital: [1] Presente [2] Ausente

Outras: _____

3.2- VAGINA [1] Normal [2] Alterada

Hiperemia: [1] Presente [2] Ausente

Condiloma: [1] Presente [2] Ausente

Conteúdo vaginal: [1] Presente [2] Ausente

3.3- COLO UTERINO: [1] Normal [2] Alterado

Colpite: [1] Presente [2] Ausente

Ectrópio: [1] Presente [2] Ausente

Endocervicite: [1] Presente [2] Ausente

Condiloma: [1] Presente [2] Ausente

Outras: _____

8.3 - Anexo III – Instrumento para coleta de dados – Laudo bacterioscópico para determinação e conclusão do esfregaço



AMBULATÓRIO DE INFECÇÕES GENITAIS

LAUDO BACTERIOSCÓPICO

HC:	Dia do ciclo menstrual: ____°	Data: / /
Iniciais:		

1. Aspecto corrimento:

Quantidade	→ Ausente <input type="checkbox"/>	Pequeno <input type="checkbox"/>	Grande <input type="checkbox"/>	• pH <input type="checkbox"/> ≤ 4,5 <input type="checkbox"/> > 4,5 • TW:	
Aspecto	→ Líquido <input type="checkbox"/>	Pastoso <input type="checkbox"/>	Mucóide <input type="checkbox"/>		
Textura	→ Homogênea <input type="checkbox"/>	Heterogênea <input type="checkbox"/>			
Cor	→ Branco <input type="checkbox"/>	Cinza <input type="checkbox"/>	Amarelo <input type="checkbox"/>	Verde <input type="checkbox"/>	Marrom <input type="checkbox"/>

GRAM

2. Células epiteliais descamativas (Achados quantitativos):

Quantidade	→ Pequena <input type="checkbox"/>	Moderada <input type="checkbox"/>	Grande <input type="checkbox"/>	
Tipo predominante	→ Superficiais <input type="checkbox"/>	Intermediárias <input type="checkbox"/>	Parabasais <input type="checkbox"/>	
Clue Cells	→ Positiva <input type="checkbox"/>	Negativa <input type="checkbox"/>		
Lise	→ Ausente <input type="checkbox"/>	Pequena <input type="checkbox"/>	Intensa <input type="checkbox"/>	

3. Células de Defesa (Leucócitos):

Neutrófilos	→ Ausente <input type="checkbox"/>	1 – 4 /Campo <input type="checkbox"/>	> 4 /Campo <input type="checkbox"/>
Outro tipo:	_____	1 – 4 /Campo <input type="checkbox"/>	> 4 /Campo <input type="checkbox"/>

4. Achados qualitativos e quantitativos da composição da flora vaginal:

I – Lactobacilos:

Quantidade	→ <input type="checkbox"/> Ausente/Escasso <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Abundante
Relação com as outras bactérias	→ Predomínio <input type="checkbox"/> Equilíbrio <input type="checkbox"/> Diminuído <input type="checkbox"/>

II – Cocobacilos:

Quantidade	→ <input type="checkbox"/> Ausente/Escasso <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Abundante
Relação com as outras bactérias	→ Predomínio <input type="checkbox"/> Equilíbrio <input type="checkbox"/> Diminuído <input type="checkbox"/>

III – Estreptococos/Estafilococos → Ausente Presente

IV – Candida/Fungo → Ausente Presente

V – Trichomonas → Ausente Presente

VI – Mobiluncus → Ausente Presente

CONCLUSÃO - Impressão Diagnóstica do esfregaço apresentado (marque com X)

Tipo de Flora vaginal →		I	II	III
Presença de processo inflamatório →	Ausente	Leve	Acentuado	

Vag. Bacteriana	Vag. Citolítica	Suspeita Endocervicite
Candidiase	Vag. Aeróbica	
Tricomomíase	Vag. Inflamatória Descamativa	Normal

Residente/Aluno Responsável (LETRA DE FORMA): _____

8.4 - Anexo IV – Biorrepositório



Universidade Estadual de Campinas
Departamento de Tocoginecologia

REGULAMENTO DO BIORREPOSITÓRIO

Pesquisa: Identificação e quantificação dos ácidos orgânicos presentes no conteúdo vaginal de mulheres com vaginose citolítica, vaginose bacteriana e candidíase vulvovaginal por espectrometria de massas

Parecer CEP: 55/2016

1. Armazenamento e uso do material biológico:
 - a) O material biológico será armazenado em natura ou na forma de RNA, DNA ou proteína. As amostras serão armazenadas em equipamentos de congelamento (Freezers -20 °C) específicos e utilizados somente para este fim. As amostras serão codificadas apenas por números e a chave de ligação entre números e nomes de pacientes será armazenada em programa de computador protegido por senha. Somente 2 pessoas terão acesso a esta chave de código, pela posse da senha – o Prof. Dr Paulo Cesar Giraldo (matricula UNICAMP – 054453), docente do Departamento de Tocoginecologia – FCM/UNICAMP e José Marcos Sanches Junior (R.A UNICAMP – 164270), aluno do curso de Pós-Graduação e Tocoginecologia (Mestrado) – FMC/UNICAMP.
 - b) A guarda e a autorização do uso do referido material estará sob a responsabilidade exclusiva da Profa. Dra. Juliana Karina Ruiz Heinrich Muçouçah (matricula UNICAMP – 29399-7), Supervisora dos Laboratórios Clínicos Especializados do Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti – UNICAMP.
 - c) Será assegurado a todos os sujeitos de pesquisa, doadores do material, a garantia de que resultados obtidos e que sejam de seu interesse lhes seja comunicada (e/ou ao médico responsável por seu tratamento, quando for o caso). Para tanto informações sobre endereço para contato e telefone serão armazenadas em um programa de computador protegido por senha, e utilizado como descrito no item a.

2. Com relação ao funcionamento do Biorrepositório:
 - a) O sujeito da pesquisa, ou seu representante legal, a qualquer tempo e sem quaisquer ônus ou prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado no Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização desta.
 - a₁ - A retirada do consentimento será formalizada por manifestação, por escrito e assinada, pelo sujeito da pesquisa ou seu representante legal, cabendo-lhe a devolução das amostras existentes.
 - b) O prazo de armazenamento do material biológico humano no Biorrepositório consta no cronograma da pesquisa correspondente e será por dez anos.



Universidade Estadual de Campinas
Departamento de Tocoginecologia

- c) Renovações da autorização de armazenamento serão permitidas após autorização do CEP/FCM/Unicamp.
- d) Ao final do período de realização da pesquisa, o material biológico humano armazenado deverá ser transferido formalmente para outro Biorrepositório ou Biobanco, mediante aprovação do CEP.

3- Sob a utilização das amostras do Biorrepositório em outros projetos concomitantes:

- a) as amostras armazenadas podem ser utilizadas em novas pesquisas aprovadas pelo CEP e, quando for o caso, pela CONEP, mediante a um novo TCLE e assinatura dos sujeitos;
- b) Poderá haver um TCLE específico para nova pesquisa ou a solicitação de sua dispensa, conforme disposto no TCLE de formação do biorrepositório.
- c) Quando fundamentada a impossibilidade de obtenção do consentimento específico para a nova pesquisa, mediante opção do sujeito em ser consultado a cada pesquisa, cabe ao CEP autorizar, ou não, a utilização do material biológico humano armazenado no Biorrepositório.

Regulamento em vigor a partir de 05/2012

Joé Marcos Sanches Junior
Responsável pelo Biorrepositório
FCM-UNICAMP

8.5 - Anexo V - Parecer consubstanciado do projeto de pesquisa analisado pela Comissão de Pesquisa CAISM/UNICAMP

Comissão de Pesquisa
CAISM/UNICAMP

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA ANALISADO PELA COMISSÃO DE PESQUISA/CAISM/UNICAMP

IDENTIFICAÇÃO		
1. Título do Projeto: " Identificação e quantificação metabolômica dos ácidos orgânicos presentes no conteúdo vaginal de mulheres com vaginose citolítica, vaginose bacteriana e candidíase vulvovaginal por espectrometria de massas"		
2. Pesquisador Responsável: José Marcos Sanches Junior		
3. Instituição do Pesquisador: Departamento de Tocoginecologia - Faculdade de Ciências Médicas - Unicamp		
4. Local onde será realizada a Pesquisa: Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - Divisão de Ginecologia		
5. Nº de inscrição no CEP/FCM: /201 .	6. Grupo:	7. Data de apresentação ao CEP: / /201 .

APRESENTAÇÃO DO PROJETO:
<p>8. Fundamentos: A microbiota vaginal é composta por diferentes tipos de bactérias que controlam o ambiente vaginal por meio de seus metabolitos, podendo conferir ou não um equilíbrio do trato genital feminino. Em situações diversas, o ecossistema vaginal pode sofrer alterações em sua composição por meio de fatores fisiológicos e/ou ambientais, ocasionando disbioses vaginais. As principais disbioses encontradas são: a vaginose citolítica e a vaginose bacteriana. A candidíase vulvovaginal é outra alteração vaginal frequente que poderá, assim como as demais causar grande impacto na vida sexual e social de muitas mulheres. O conhecimento da diversidade microbiana e da presença de diferentes substâncias, em especial os ácidos orgânicos, no trato genital inferior feminino, poderá ajudar no entendimento de como se faz a homeostase deste ecossistema, tão importante para a reprodução humana. O estudo do metabolômico do conteúdo vaginal poderá esclarecer muitas dúvidas e ajudar na compreensão das interações que ocorrem na vagina de mulheres com VC, VB e CVV. Objetivos: Avaliar o perfil metabolômico vaginal de mulheres com vaginose citolítica, vaginose bacteriana e candidíase vulvovaginal, por quantificação dos ácidos orgânicos presentes no conteúdo vaginal. Metodologia: Estudo de corte transversal com 80 mulheres, igualmente distribuídas em grupos com VC, VB, CVV e sem infecção vulvovaginal (controles), sendo 20 mulheres por grupo. Após anamnese detalhada, todas as pacientes serão submetidas a um exame especular de rotina no Ambulatório de Infecções Genitais Femininas – CAISM/UNICAMP para coleta de material vaginal para realização de bacterioscopia, teste de pH, cultura de fungos e identificação e quantificação dos ácidos orgânicos presentes. O diagnóstico das vulvovaginites serão feitos pelos resultados das bacterioscopias, culturas vaginais e critério de Nugent. A mensuração dos ácidos será feita por técnicas de espectrometria de massas por ESI (-)/MS, LC-MS/MS e MALDI-TOF, sendo analisados e os resultados comparados entre as vulvovaginites estudadas e o controles.</p>

AVALIAÇÃO DOS RISCOS E BENEFÍCIOS:
<p>9. A paciente não será submetida a procedimentos diferentes daqueles propostos na Assistência, para a coleta de amostras biológicas. Incômodos e riscos estão claramente descritos no TCLE. Os benefícios serão obtidos na contribuição ao conhecimento científico, para novas perspectivas no entendimento dos desequilíbrios da microbiota vaginal.</p>

COMENTÁRIOS E CONSIDERAÇÕES SOBRE A PESQUISA:
10.

CONSIDERAÇÕES SOBRE OS TERMOS DE APRESENTAÇÃO OBRIGATÓRIA:
11.

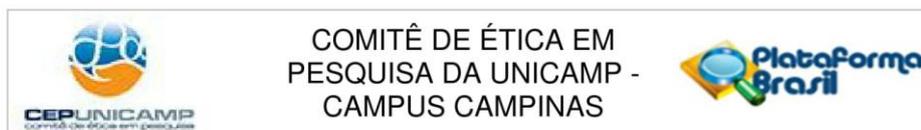
RECOMENDAÇÕES:
12.

CONCLUSÕES OU PENDÊNCIAS E LISTA DE INADEQUAÇÕES:
13.

14. SITUAÇÃO DO PARECER:			
<input checked="" type="checkbox"/> Aprovado	<input type="checkbox"/> Não Recomenda a Aprovação	<input type="checkbox"/> Em Pendência	<input type="checkbox"/> Com Destaque

Campinas, 9 de setembro de 2016.	Nome e assinatura do(s) membro(s) relator(es):  Prof. Dr. Fernanda Garanhani de Castro Surita Presidente da Comissão de Pesquisa - DTG/CAISM/Unicamp
----------------------------------	---

8.6 - Anexo VI - Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp – Campus Campinas



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Identificação e quantificação dos ácidos orgânicos presentes no conteúdo vaginal de mulheres com vaginose citolítica, vaginose bacteriana e candidíase vulvovaginal por espectrometria de massas

Pesquisador: José Marcos Sanches Junior

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 60648016.8.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - CAISM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

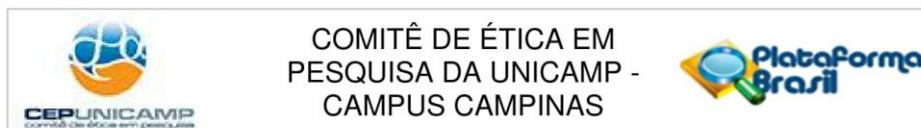
DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.808.639

Apresentação do Projeto:

Nos dias atuais onde a biotecnologia emprega um importante papel para o diagnóstico e tratamento de inúmeras doenças, muito métodos vêm sendo utilizados para melhor compreender os processos de fisiopatologia das doenças. As disbioses do trato genital inferior feminino além de muito frequentes durante o período do menacme causando desconfortos genitais, estão associadas a maior probabilidade de aquisição de doenças como HIV, HPV e DIP (1-3). A composição do microbioma vaginal humano é fundamental para a manutenção deste ambiente, possibilitando a primeira linha de defesa contra patógenos (4). A instabilidade do ecossistema vaginal é um fator bastante conhecido pela clínica ginecológica e sua variação pode ser decorrente de diversos fatores, sejam eles fisiológicos ou externos. A microbiota vaginal é formada por diversos microrganismos que promovem um equilíbrio do microambiente local, sendo este mantido por complexas interações entre a microbiota normal, os produtos metabólicos microbianos, o estado hormonal e a resposta imune do hospedeiro (5). A microbiota vaginal de mulheres em idade reprodutiva e em condições normais é composta por lactobacilos (LB), que através de seu metabolismo acidificam o ambiente vaginal, favorecendo um ambiente hostil para instalação de agentes patogênicos. Os lactobacilos presentes na vagina desempenham um papel fundamental para a proteção vaginal através de diferentes mecanismos, tais como a produção de

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.808.639

uma variedade de compostos que atuam como bactericidas, coagregação, exclusão competitiva e imunomodulação (6, 7). As espécies mais prevalentes em mulheres saudáveis, isoladas em meio de cultura seletivas e identificadas por métodos moleculares, são *L. crispatus* (30,1%), *L. jensenii* (26,5%), *L. gasseri* (22,9%) e *L. vaginalis* (8,4%). Além de mais prevalentes, as espécies *L. crispatus*, *L. jensenii* e *L. gasseri* foram as que atingiram, em média, menores valores de pH (próximos a 4,0) e apresentaram melhor produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), características sugeridas como importantes para proteção contra várias infecções, principalmente a vaginose bacteriana (8). Todavia, a ausência ou o supercrescimento destes LB poderá causar as disbioses e facilitar o aparecimento de infecções (9, 10). Considera-se nos dias atuais que a ausência ou diminuição acentuada do crescimento dos LB dá oportunidade ao desenvolvimento de bactérias anaeróbicas associadas à Vaginose Bacteriana e se tornaram muito mais importante para o entendimento da fisiopatogênese da VB que a própria *Gardnerella vaginalis*. Por outro lado, apesar de ainda não estar bem definida, a Vaginose Citolítica (VC), manifesta-se em decorrência do supercrescimento dos LB. Na primeira, o crescimento exagerado de bactérias anaeróbicas e a ausência de LB determinará a produção de substâncias que além de promover o mau odor genital, ainda promoverão a degradação da matriz extracelular dos tecidos e conseqüentemente, a facilitação de infecções mais graves (11, 12). Na segunda, há a promoção acentuada da lise celular, liberação de histamina e conseqüente descamação epitelial intensa acompanhada de queimação vaginal, mimetizando a Candidíase vaginal. Provavelmente, o crescimento de bactérias nocivas (associadas à VB) se faz por falta de mecanismo de controle que estão muito fundamentados na presença de ácidos orgânicos. No conteúdo vaginal de mulheres saudáveis pode-se encontrar diferentes ácidos orgânicos que, por sua vez, manterão o pH vaginal baixo, inibirão o crescimento bacteriano anaeróbicas, mas não de lactobacilos, e estimularão a resposta imune vaginal por ativação da via Th17 dos linfócitos (13-15). Mediante aos estudos recentes sobre os processos fisiológicos e as interações internas e externas sob o ambiente vaginal, muitas informações sobre o mecanismo fisiopatológico da vaginose bacteriana (VB), suas interações com o epitélio vaginal, metabólitos provenientes da atuação das bactérias anaeróbicas e até mesmo estudos acerca da especificidade bacteriana presente na infecção já são sobejamente conhecidos. No entanto, apesar de existirem trabalhos sobre as outras disbioses mais comuns, a vaginose citolítica (VC) ainda não é bem estudada. Da mesma forma, os entendimentos da fisiopatogênese da Vaginose bacteriana e da Candidíase vaginal poderiam ficar enriquecidos com maiores conhecimentos do comportamento dos diferentes ácidos orgânicos liberados na luz vaginal. Em um indivíduo saudável, há um equilíbrio entre os microrganismos presentes, onde organismos patogênicos e não patogênicos

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.808.639

podem ser encontrados de forma harmônica. Quando uma infecção está instalada o equilíbrio encontra-se perturbado, acarretando em possíveis mudanças drásticas na microbiota (7). Relacionando este contexto ao ambiente vaginal, já é conhecido pela ginecologia sobre as características microbiológicas que levam às disbiose por *Candida* spp, *Gardnerella vaginalis* e *Mobiluncus* por exemplo. Porém, ainda existe uma lacuna no conhecimento sobre os processos metabólicos que podem levar à CVV, e principalmente para à VC que até o momento foi muito pouco estudada. A VC é muito comum em mulheres em idade reprodutiva, sendo caracterizada pelo crescimento excessivo de lactobacilos devido a razões ainda desconhecidas. Mediante ao crescimento exacerbado de lactobacilos no ambiente vaginal ocorre uma diminuição do pH, danificação do epitélio vaginal expresso pela lise celular (citólise) levando a sintomas clínicos como queimação, dor, prurido, dispareunia e corrimento abundante em muitos casos (10). Uma vez que os sintomas da VC são muito semelhantes ao da CVV, é muito comum que na prática ginecológica possam ocorrer erros no diagnóstico e conseqüentemente oferecer um tratamento inadequado para a paciente, sendo fundamental para a prática em ginecologia o exame bacterioscópico, cultura para fungos, podendo eliminar a possibilidade de candidíase e evitar quadros recorrentes e/ou agudos de VC. Alguns estudos já mostraram a prevalência da VC e a relação com os sintomas da CVV, mostrando que estes podem ser muito semelhantes estimando uma taxa de prevalência que varia de 1,83-7,1% (16). Considerando a similaridade dos sintomas e que pouco se sabe sobre os processos que levam a lise do epitélio vaginal, a caracterização do metabolismo envolvido no processo de degradação celular do epitélio escamoso vaginal irá colaborar para melhores elucidações sobre o mecanismo de patogenicidade dos metabólitos produzidos pelos lactobacilos. Em mulheres em idade reprodutiva é comum que haja a presença de lactobacilos que favorecem um pH ácido devido à produção de ácido láctico, enquanto as bactérias que se associam à VB, geralmente anaeróbicas, produzem ácidos graxos de cadeia curta, contribuindo assim para a disbiose vaginal e desenvolvimento da infecção (17-19). Estudos anteriores sobre VB mostraram que ácidos orgânicos como o acetato e succinato são metabólitos típicos produzidos por *Provetella* e *Mobiluncus* spp (20) e ainda, o malonato juntamente com o acetato diferenciam a VB do estado normal de uma paciente, bem como a diminuição de certos aminoácidos devido ao processo de descarboxilação de amins biogênicas (21). Ainda, em estudos *in vitro* foi constatado que o ácido succínico causa inibição potente da quimiotaxia, enquanto o ácido acético causa baixa inibição migração leucocitária e isto justificaria a ausência de polimorfonucleares nos esfregaços vaginais de mulheres com VB (20). Em condições normais o crescimento excessivo de lactobacilos a vagina pode apresentar uma alta disponibilidade de

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.808.639

maltose, podendo ser atribuído este crescimento devido uma possível síntese eficiente de glicogênio e/ou secreção de - amilase pelo epitélio vaginal em condições normais (22), em contraponto, a concentração de glicose em pacientes com VB foi superior em pacientes normais (23). Contudo, os estudos sobre o metaboloma em mulheres com VB possibilitou compreensões sobre o metabolismo e a fisiopatologia da infecção, podendo assim partir para melhores avaliações e prognósticos para esta disbiose vaginal. O metabolismo proveniente dos microrganismos bem como sua interação com o hospedeiro favorece para a homeostasia do sistema genital feminino. Diversos estudos sobre os ácidos presentes no conteúdo vaginal colaboram para melhores elucidacões sobre os mecanismos de interações entre a microbiota e o epitélio vaginal. Hialurona ou ácido hialurônico (HA, do inglês hyaluronan) é o principal componente da MEC, sendo responsável pelo seu preenchimento e, por manter a integridade do tecido e sua homeostase. Bioquimicamente, é um hidrato de carbono complexo formado por unidades repetidas de dissacárido de ácido Dglucorônico e N-acetil-D-glucosamina, portanto, proveniente do metabolismo da glicose (24) Imai et al. 2014 (25) em um estudo in vitro pode avaliar os processos fisiopatológicos que estariam relacionados à atuação do ácido butírico na infecção do HIV. Em culturas celulares, foi observado que o ácido butírico poderia induzir uma acetilação das histonas, ocasionando a replicação do HIV – 1 por inibição de HDAC. A Anaerococcus tetradius, encontrada na vaginal, é uma das bactérias produtoras do ácido butírico, podendo estar envolvida na progressão da AIDS por reativação do próviro do HIV latente. O metaboloma vem sendo estudado em diversos sistemas orgânicos a fim de promover melhores entendimentos sobre o comportamento da microbiota e sua contribuição para o metabolismo do hospedeiro, podendo identificar possíveis biomarcadores para diversas patologias (26-28). A partir do estudo metabolômico por técnicas de Fingerpring por ESI (-), LC.MS/MS e MALDI-TOF a determinação dos ácidos presentes no conteúdo permitirá uma associação entre os metabólitos presentes no conteúdos vaginal e seu processo fisiopatológico no processo saúde e doença do trato genital feminino. Os estudos estão direcionados na atuação dos lactobacilos em suas condições normais para a proteção e acidificação vaginal, porém a determinação do metaboloma vaginal por espectrometria de massas (EM) poderá esclarecer a relação dos microrganismos presentes na vagina e seus metabólitos, podendo assim caracterizar a fisiopatogênese da VC, CVV e VB mediante aos produtos liberados pele metabolismo bacteriano. Com esta perspectiva, o presente projeto busca melhores elucidacões acerca das disbioses vaginais mais frequentes através da caracterização do metabolismo e suas relações com o ambiente vaginal saudável e alterado. Hipótese: • Haverá uma diferença dos tipos de ácidos orgânicos presentes entre os

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.808.639

grupos de mulheres com vaginose citolítica, vaginose bacteriana, candidíase vulvovaginal e mulheres sem disbiose vaginal; • Haverá uma diferença na quantidade dos metabólitos presentes entre os grupos de mulheres com vaginose citolítica, vaginose bacteriana, candidíase vulvovaginal e mulheres sem disbiose vaginal; • A comparação do metabóloma vaginal em mulheres saudáveis e com vaginose citolítica, vaginose bacteriana e candidíase vulvovaginal indicará uma composição metabólica diferente entre os grupos, principalmente em relação aos ácidos orgânicos, carboidratos, e proteínas presentes no fluido vaginal. Metodologia Proposta: As mulheres que aceitarem a participar do estudo serão submetidas a um exame especular para coletas especificadas a seguir: Identificação e classificação das diferentes vulvovaginites no conteúdo vaginal: Mensuração do pH vaginal; Bacterioscopia a fresco; Bacterioscopia com coloração de Gram; Cultura para fungo. Identificação e quantificação dos diferentes ácidos presentes no conteúdo vaginal: Fingerprint por ESI (-) – MS; Perfil metabolômico por LC-MS/MS; Caracterização de microrganismos e seus metabólitos por MALDI-TOF. Critério de Inclusão: Depois de identificadas as mulheres elegíveis no estudo e atendidas no Ambulatório de Infecções Genitais I do CAISM, os procedimentos da pesquisa serão explicados detalhadamente e será solicitada a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Para a inclusão das mulheres, os seguintes critérios serão seguidos: Critério de Inclusão • Mulheres entre 18 e 40 anos; • Mulheres com diagnóstico microbiológico de VC, VB, CVV; Mulheres com resultado de Papanicolaou negativo dentro do período de um ano; Mulheres sem desequilíbrio de microbiota vaginal para compor o grupo controle. Critério de Exclusão: Critérios de exclusão • Mulheres grávidas; • Mulheres virgens; • Mulheres na menopausa; • Outras malignidades exceto câncer de pele não - melanoma; • Imunossupressão devido a doenças tais como AIDS, transplantes ou uso de medicamentos imunossupressores como prednisona, Imuran ou quimioterapia para doenças como o Lúpus Sistêmico; • Impedimento cognitivo ou de outras maneiras que impossibilitem a obtenção do consentimento informado; • Incapacidade para ler e responder em português; • Não obtenção da assinatura do termo de consentimento.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar o perfil metabolômico vaginal de mulheres com vaginose citolítica, vaginose bacteriana e candidíase vulvovaginal. Objetivo Secundário: • Identificar os ácidos orgânicos presentes no conteúdo vaginal de mulheres com vaginose citolítica, vaginose bacteriana, candidíase vulvovaginal e controles; • Quantificar os ácidos orgânicos presentes no conteúdo vaginal de mulheres com vaginose citolítica, vaginose bacteriana, candidíase vulvovaginal e controles; • Comparar o perfil metabolômico entre os grupos de mulheres e com

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.808.639

vaginose citolítica, vaginose bacteriana, candidíase vulvovaginal e o grupo controle.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo informações da pesquisadora: Será coletado apenas o material vaginal, por um swab, como procedimento de rotina do Ambulatório de Infecções Genitais - CAISM, não apresentando riscos previsíveis para a paciente. Benefícios: Colaborar para a pesquisa e por meio dos resultados esperados, fornecer possíveis rumos no diagnóstico das vulvovaginites através do melhor entendimento fisiopatológico da Vaginose citolítica, Vaginose bacteriana e Candidíase vulvovaginal.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Este protocolo se refere ao Projeto de Pesquisa de Mestrado intitulado "Identificação e quantificação dos ácidos orgânicos presentes no conteúdo vaginal de mulheres com vaginose citolítica, vaginose bacteriana e candidíase vulvovaginal por espectrometria de massas", cujo pesquisador responsável é José Marcos Sanches Junior, com equipe de pesquisa composta por: Marcos Nogueira Eberlin e PAULO CESAR GIRALDO. A pesquisa foi enquadrada na área temática "Ciências Biológicas" e "Ciências da Saúde" e a Instituição Proponente é o Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - CAISM. Segundo as Informações Básicas do Projeto, a pesquisa tem orçamento estimado em R\$8.407,15 (Oito mil, quatrocentos e sete reais) e o cronograma apresentado contempla: Inclusão das Mulheres e realização das técnicas e exames de 14/11/2016 a 28/04/2017. Cronograma adequado. Na pesquisa serão abordadas 80 mulheres de 18 a 40 anos e será realizada no Ambulatório de Infecções Genitais Femininas do CAISM. Todas as pendências anteriores foram atendidas.

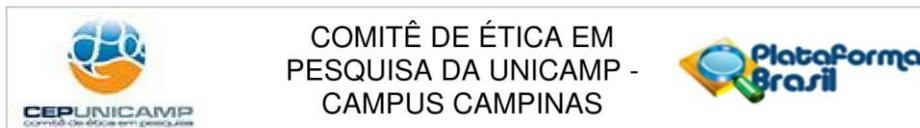
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O pesquisador apresentou: Folha de Rosto assinada pelo mesmo e pelo Diretor do Hospital da Mulher/CAISM/UNICAMP; Projeto da PB; Projeto detalhado; Parecer de aprovação da Comissão de Pesquisa do CAISM; Declaração em formulário da FAPESP; TCLE; Regulamento Biorrepositório, comprovante de atestado de matrícula, Carta resposta ao CEP e autorização do Responsável pelo Ambulatório de Infecções Genitais Femininas do CAISM datada e assinada.

Recomendações:

- 1-Lembramos que o TCLE deve ser elaborado em duas vias, sendo uma retida pelo sujeito da pesquisa ou por seu representante legal e uma arquivada pelo pesquisador (resolução 466/2012).
- 2-Se o TCLE tiver mais de uma página, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, e o pesquisador responsável deverão rubricar todas as folhas desse documento, apondo suas

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.808.639

assinaturas na última página do referido termo (Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS).

3-No cronograma, observar que o início do estudo somente poderá ser realizado após aprovação pelo CEP, conforme compromisso do pesquisador com a resolução 466/2012

4. Ao pesquisador cabe desenvolver o projeto conforme delineado, elaborar e apresentar os relatórios parciais e final, bem como encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto (resolução 466/2012).

5. Em estudos retrospectivos, caso o pesquisador encontre dados que possam modificar o prognóstico ou tratamento dos sujeitos de pesquisa, recomenda-se que tais informações sejam transmitidas aos participantes e/ou anexadas ao prontuário para conhecimento da equipe clínica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências anteriores foram atendidas, não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O sujeito de pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126	CEP: 13.083-887
Bairro: Barão Geraldo	
UF: SP	Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936	Fax: (19)3521-7187
	E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.808.639

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_796435.pdf	26/10/2016 14:39:32		Aceito
Outros	biorrepositorioCorrecao.pdf	26/10/2016 14:38:46	José Marcos Sanches Junior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLCorrecao.pdf	26/10/2016 14:37:59	José Marcos Sanches Junior	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDetalhadoCorrecao.pdf	26/10/2016 14:37:27	José Marcos Sanches Junior	Aceito
Outros	Carta.pdf	26/10/2016 14:36:41	José Marcos Sanches Junior	Aceito
Outros	AutorizacaoCAISM.pdf	26/10/2016 14:36:13	José Marcos Sanches Junior	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorrepositorio.pdf	26/09/2016 15:57:34	José Marcos Sanches Junior	Aceito

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.808.639

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	26/09/2016 15:57:17	José Marcos Sanches Junior	Aceito
Outros	ParecerCONSUBSTANCIADOCAISM.pdf	26/09/2016 15:23:26	José Marcos Sanches Junior	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	MANIFESTAcAODIRIGENTE.pdf	26/09/2016 15:22:05	José Marcos Sanches Junior	Aceito
Outros	AtestadoMatriculaMARCOS.pdf	26/09/2016 15:20:40	José Marcos Sanches Junior	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOMETABOLOMA.pdf	26/09/2016 15:19:39	José Marcos Sanches Junior	Aceito
Folha de Rosto	FOLHAROSTO.pdf	26/09/2016 15:19:20	José Marcos Sanches Junior	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 07 de Novembro de 2016

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br