

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Trichomonas vaginalis e *Candida* spp. em amostras de urina: isolamento,
suscetibilidade a fármacos e determinação da virulência

DÉBORA DA LUZ BECKER

PORTO ALEGRE, 2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Trichomonas vaginalis e *Candida* spp. em amostras de urina: isolamento,
suscetibilidade a fármacos e determinação da virulência

Dissertação apresentada por
Débora da Luz Becker para obtenção do GRAU
DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof^ª. Dr. Tiana Tasca
Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre M Fuentefria

PORTO ALEGRE, 2013.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 25.03.2013 pela banca examinadora constituída por:

Prof^a. Dr. Marilise Brittes Rott

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr. Patrícia Valente da Silva

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Valério Rodrigues Aquino

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Becker, Débora da Luz

Trichomonas vaginalis e Candida spp. em amostras de urina: isolamento, suscetibilidade a fármacos e determinação da virulência / Débora da Luz Becker. -- 2013.

159 f.

Orientadora: Tiana Tasca.

Coorientador: Alexandre Fuentesfria.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Trichomonas vaginalis. 2. Candida spp.. 3. suscetibilidade a fármacos. 4. biofilme. I. Tasca, Tiana, orient. II. Fuentesfria, Alexandre, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Parasitologia e no Laboratório de Pesquisa em Micologia do Departamento de Análises da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. A autora recebeu bolsa de estudos do CNPq.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha família, meus pais e meu irmão, que são meu exemplo de vida, de honestidade e de dedicação. Obrigada por todos os ensinamentos, por todo o amor e por sempre acreditarem em mim e nos meus sonhos. Pai, obrigada por me proporcionar tudo aquilo que tu batalhaste tanto para ter. Mãe, obrigada por todo o carinho e preocupação.

À Profa. Dr. Tiana Tasca por todo exemplo de profissionalismo e dedicação. Acredito que sem a sua empolgação e confiança eu não teria chegado até aqui. Obrigada por todo o carinho, paciência, orientação, conselhos e puxões de orelha. E por me fazer acreditar em mim e nos meus sonhos.

Ao Prof. Dr. Alexandre Fuentefria pela orientação e pela oportunidade de realização deste mestrado. Agradeço pelos intensos debates que certamente me fizeram crescer profissionalmente.

Ao Prof. Dr. Alexandre Macedo e seu grupo de pesquisa, obrigada pela convivência e pelas oportunidades.

À Ana Lúcia Antunes, obrigada pelos conselhos, ajuda e pela disponibilidade.

Aos meus colegas de laboratório de parasitologia, Amanda, Muriel, Camila, Patrícia, Grazi, Nícolas, Dejoara, Camilinha, Lúcia, Clara, Ana Becker e Júlia. Obrigada pelos momentos de descontração, pelos cafés com chocolate após o almoço, pelas risadas e principalmente, por toda a ajuda e amizade. Cada um tem uma participação muito especial neste trabalho. Aproveito o momento para parabenizar à Tiana por ter formado um grupo de pesquisa como este, onde as pessoas se gostam, se ajudam e se respeitam. Fui muito feliz estes dois anos que convivi diariamente com todos vocês e sentirei muita saudade.

Gostaria de agradecer em especial à Odelta, uma grande amiga e parceira que encontrei nesta caminhada. Obrigada pela amizade, pela paciência, pelo bom-humor e por toda a dedicação. Obrigada pelas madrugadas de trabalho e por me fazer acreditar que era possível quando tudo parecia não ter mais solução.

As colegas do laboratório de micologia, Amanda, Grazi, Vanessa, Aline, Fernanda e Bruna, por fazerem o mundo micológico mais divertido. Em especial à Roberta, uma “grande” amiga, obrigada por compartilhar comigo tantas angústias e ao mesmo tempo tantas risadas. À Rosana por toda a ajuda e paciência.

A minha IC Paula agradeço pela amizade e parceria. Apesar de quase me deixar louca tantas vezes essa tagarela alegrava meus dias! Obrigada por entrar de cabeça neste projeto junto comigo.

À Profa. Dr. Marilise Brittes Rott, por me apresentar o fascinante mundo da parasitologia e por fazer eu me apaixonar por esta área da pesquisa.

As minhas queridas amigas da faculdade, Luisa, Jaque, Jú, Bruna e Chris, por toda a amizade e todo o apoio. Cada uma colaborou de alguma maneira para a realização deste projeto. Lú e Bru, obrigada por compartilharem comigo a rotina da Faculdade de Farmácia. Chris, obrigada por todos os conselhos e descobertas. Jú, obrigada por salvar os meus isolados. Jaque, obrigada por toda a ajuda e pelos lindos géis.

As minhas eternas amigas de Torres, por entenderem a minha ausência e por me fazerem tão feliz. À minha eterna amiga Vanessa e a minha afilhada Ana Luiza, obrigada por fazerem parte da minha vida. A minha “irmã emprestada” Ana Paula, por toda a amizade.

À Rosa e ao Celso, por compartilharem comigo todas as angústias desses dois anos, e por ouvirem meus desabafos mesmo sem entenderem muito bem do que eu estava falando. Obrigada pelo carinho e por me acolherem tão bem.

Ao Vinícius, meu amor, agradeço por toda a compreensão, incentivo, paciência e por todo o carinho. Obrigada por acreditar em mim e me mostrar que sou capaz.

Aos meus avós e demais familiares, por tantos momentos de alegria.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado e ao PPGCF pela oportunidade.

Quero deixar aqui um agradecimento geral, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto. Tive muita sorte de encontrar pessoas maravilhosas nesta minha caminhada.

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”

George Bernard Shaw

RESUMO

Trichomonas vaginalis é o agente etiológico da tricomonose, a doença sexualmente transmissível não viral mais comum no mundo. Segundo a OMS 276,4 milhões de novos casos ocorrem anualmente no mundo e falhas no tratamento e resistência ao metronidazol têm sido relatadas. A presença de fungos leveduriformes no exame de urina pode ser definida como candidúria, no entanto, outros parâmetros são necessários para auxiliar no diagnóstico. O gênero *Candida* é o patógeno mais frequentemente isolado em infecções nosocomiais do trato urinário, tendo importantes implicações clínicas, principalmente em pacientes cateterizados. Neste estudo, investigamos a associação entre resistência ao metronidazol, expressão da enzima piruvato ferredoxina oxidoreductase (PFOR) e a presença de infecção de *Mycoplasma hominis* e trichomonasvirus (TVV) em isolados de *T. vaginalis*, ATCC (2), de longo tempo de cultivo em laboratório (2) e isolados frescos obtidos de amostras de urina (30). Além disso, a suscetibilidade de 25 isolados de *Candida* spp. a cinco diferentes antifúngicos foi avaliada e comparada com a capacidade de formar biofilme em placa de poliestireno, sendo oito isolados fortemente produtores de biofilme selecionados para ensaios de capacidade de formação de biofilme em corpo de prova e comparação da concentração inibitória mínima (CIM) de células planctônicas, células em biofilme (CMEB) e células pós-formação de biofilme (CIMPB). Quinhentas e trinta amostras de urina foram analisadas para a presença de *T. vaginalis* (21 positivas) e *Candida* spp. (25 positivas). Dos 34 isolados de *T. vaginalis* avaliados, 61,8% estavam infectados por *M. hominis* e 88,2% por diferentes espécies de TVVs. Todos os isolados foram sensíveis ao metronidazol e expressaram a PFOR. O perfil de sensibilidade foi observado na maioria dos isolados de *Candida* e 92% das leveduras foram produtoras de biofilme em placa, não sendo encontrada correlação entre a capacidade de formar biofilme e o perfil de suscetibilidade a fármacos. Todas as leveduras selecionadas para o ensaio de biofilme em corpo de prova foram capazes de formar biofilme em sonda urinária e o ensaio para determinação da CMEB demonstrou a alta resistência das células leveduriformes quando na forma de biofilme. A partir dos resultados obtidos, podemos inferir que a relação simbiótica entre o *T. vaginalis* e os micro-organismos pesquisados não está correlacionada com sua resistência a fármacos. Nossos resultados demonstram também

a alta prevalência de isolados de *T. vaginalis* infectados com *M. hominis* e diferentes espécies de TVVs, além disso, foi observado um perfil de sensibilidade ao metronidazol. Quanto aos resultados encontrados para *Candida*, podemos observar a alta capacidade de formação de biofilme deste gênero e o aumento significativo da resistência de células em biofilme a diferentes classes de antifúngicos. Portanto, nosso estudo aponta resultados relevantes para o conhecimento de fatores de virulência e do perfil de isolados de *T. vaginalis* e *Candida* spp. do Sul do Brasil, contribuindo para a profilaxia e conduta terapêutica da tricomonose e da candidúria.

Palavras-chave: *T. vaginalis*, *Candida* spp., fatores de virulência, suscetibilidade, biofilme.

ABSTRACT

Trichomonas vaginalis is the causative agent of trichomonosis, the non-viral sexually transmitted disease most common in the world. According to WHO 276.4 million new cases occur annually worldwide and treatment failures and resistance to metronidazole have been reported. The presence of yeasts in urine tests may be defined as candiduria, however, other parameters are needed to assist in diagnosis. The genus *Candida* is the pathogen most frequently isolated in nosocomial urinary tract infections, with important clinical implications, especially in catheterized patients. In this study, we investigated the association between metronidazole resistance, pyruvate ferredoxin oxireductase (PFOR) enzyme expression and the presence of *M. hominis* and TVVs infection of ATCC, long-term grown, and fresh clinical *T. vaginalis* isolates from urine samples. Five different antifungal agents were evaluated in the susceptibility assay of 25 isolates of *Candida* spp. The ability to form biofilm on polystyrene plate was compared to antifungal susceptibility and eight *Candida* isolates strongly biofilm producers were selected for testing the ability of biofilm formation in the specimen and comparing the minimum inhibitory concentration (MIC) of planktonic cells, biofilm cells (MBEC), and post-biofilm cells (PBC). Five hundred and thirty urine samples were analyzed for the presence of *T. vaginalis* (21 positive) and *Candida* spp. (25 positive). Among the 34 *T. vaginalis* isolates included in this study, 61.8% were infected by *M. hominis* and 88.2% by different TVVs species. All isolates were metronidazole sensitive and did express PFOR. Sensitivity profile was observed in most *Candida* isolates and 92% of the yeasts produced plate biofilm, and no correlation between the ability to form biofilm and the drug susceptibility profile was found. All yeasts selected for testing biofilm on the test specimen were able to form biofilm on urinary catheter. The determination of MBEC demonstrated high resistance in yeast cells when in biofilm form. Overall, our results show that the symbiotic relationship between *T. vaginalis* and the microorganisms screened is not correlated with drug resistance. Our results also demonstrate the high prevalence of *T. vaginalis* isolates infected with *M. hominis* and different species of TVVs. Also, in our study it was observed a metronidazole sensitivity profile. Considering *Candida* spp., we can observe the high capacity of

biofilm formation of this genus and the significant increase in the resistance of biofilm cells to different classes of antifungal. Furthermore, our study originated relevant results to the knowledge of virulence factors and the profile of *T. vaginalis* and *Candida* spp. isolates of the South of Brazil, contributing for the prophylaxis and therapeutic management of trichomonosis and candiduria.

Keywords: *T. vaginalis*, *Candida*, virulence factors, susceptibility, biofilm.

SUMÁRIO

I.Introdução.....	1
I.1. <i>Trichomonas vaginalis</i> e <i>Candida</i> spp. isolados da urina.....	3
I.2. <i>Trichomonas vaginalis</i>	4
I.3. Tricomonose.....	6
I.3.1. Mecanismos de Patogenicidade	12
I.3.2. <i>Trichomonas vaginalis</i> e <i>Mycoplasma hominis</i>	14
I.3.3. <i>Trichomonas vaginalis</i> e Trichomonasvirus (TVVs).....	16
I.4. <i>Candida</i> spp.	18
I.5. Candidúria	20
I.5.1. Mecanismos de patogenicidade.....	23
I.5.2. Biofilme.....	24
I.6. Agentes antifúngicos	26
I.6.1. Mecanismos de resistência aos antifúngicos	26
I.6. Objetivos	31
II.Artigos Científicos.....	35
II.1. CAPÍTULO 1. Débora da Luz Becker, Odelta Santos, Amanda Piccoli Frasson, Graziela de Vargas Rigo, Geraldo Attilio De Carli, Alexandre José Macedo, Tiana Tasca. Lack of correlation of metronidazole resistance and <i>Mycoplasma hominis</i> and TVV presence in a collection of <i>Trichomonas vaginalis</i> isolates.	37
II.2. CAPÍTULO 2 - Débora L. Becker, Paula Lüttjohann Rodrigues, Alexandre M. Fuentefria. Biofilm Formation and Antifungal Susceptibility from <i>Candida</i> Urine Isolated from Ambulatory Patients.....	69
III.Discussão Geral	99
III.2.Conclusões Gerais	113
III.3.Perspectivas	117
III.4.Referências	121
III.5.Anexos.....	141
III.5.1. Carta de aprovação do Comitê de Ética da UFRGS	143

I.Introdução

I.1. *Trichomonas vaginalis* e *Candida* spp. isolados da urina

A urina é um material de diagnóstico de fácil coleta e indolor ao paciente, o que proporciona melhor adesão à coleta do material, pois não é um método invasivo (VATANSHENASSAN *et al.*, 2010). Os micro-organismos que podem ser encontrados no sedimento urinário são, principalmente, bactérias, leveduras e protozoários, sendo que entre as leveduras, o gênero *Candida* é o mais frequente, e entre os protozoários, o *Trichomonas vaginalis* é o mais comumente encontrado (SILVA *et al.*, 2005; KAUFFMAN *et al.*, 2011). Assim, justifica-se o uso deste material biológico para o isolamento destes patógenos.

Trichomonas vaginalis é o protozoário causador da tricomonose, a doença sexualmente transmissível (DST) não viral mais comum no mundo. Esta infecção está bem associada a sérias consequências à saúde, como o aumento da suscetibilidade ao vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV, do inglês *human immunodeficiency virus*) (QUINLIVAN *et al.*, 2012), problemas na gravidez (KLEBANOFF *et al.*, 2001), predisposição ao câncer cervical (VIKKI *et al.*, 2000) e doença inflamatória pélvica (CHERPES *et al.*, 2006). Outro importante patógeno humano são as leveduras do gênero *Candida*, que podem ser consideradas patógenos oportunistas, os quais dependem de fatores próprios de virulência e fatores predisponentes do hospedeiro para causar infecção (CAMARGO *et al.*, 2008; SENEVIRATNE *et al.*, 2008). Na candidúria, a presença de espécies de *Candida* spp. na urina é um achado clínico comum, sendo o principal gênero envolvido em infecções fúngicas oportunistas do trato urinário (SOBEL *et al.* 2011).

Em decorrência do impacto da tricomonose e da candidúria na saúde pública e a complexidade dos mecanismos envolvidos na interação parasito-hospedeiro, se torna evidente a necessidade de estudos que investiguem possíveis fatores de virulência destes patógenos, bem como a sua suscetibilidade a fármacos contribuindo desta forma para o conhecimento do perfil dos isolados de *T. vaginalis* e *Candida* spp. da nossa região, auxiliando assim, na profilaxia e conduta terapêutica das infecções causadas por estes patógenos.

I.2. *Trichomonas vaginalis*

Trichomonas vaginalis é um protozoário membro da família Trichomonadidae, da ordem Trichomonadida, da classe Parabasalia e do filo Zoomastigina (SCHEWEBKE e BURGESS, 2004). *T. vaginalis* é a espécie mais amplamente estudada entre os tricomonádídeos, devido a sua capacidade de parasitar o trato genitourinário humano e causar infecção.

Morfologicamente, *T. vaginalis* é uma célula com tamanhos e formas variados. Tipicamente o parasito apresenta forma piriforme, elipsoide ou oval, no entanto, condições físico-químicas como pH, temperatura, tensão de oxigênio e força iônica podem afetar sua forma (HONIGBERG e BRUGEROLLE, 1990). Como todos os tricomonádídeos, não possui estágio cístico, somente trofozoítico (Figura 1). Em culturas axênicas o protozoário tende a ser mais uniforme, adquirindo formas elipsoides ou ovais, diferentemente do que ocorre quando o parasito encontra-se em contato com células epiteliais vaginais (CEVHs), onde assume uma aparência ameboide (ARROYO *et al.*, 1993). O tamanho do trofozoíto é variado, em média, apresenta 9,7 µm de comprimento por 7,0 µm de largura (BENCHIMOL, 2004). O trofozoíto possui cinco flagelos, sendo quatro localizados na região anterior, enquanto o quinto é incorporado à membrana ondulante do parasito. Os flagelos e a membrana ondulante são as estruturas responsáveis pela motilidade característica da célula. O núcleo encontra-se localizado próximo à extremidade anterior e, assim como em outros eucariotos, é circundado por um envelope nuclear poroso. O axóstilo é uma estrutura rígida e hialina que se projeta a partir da pelta através do centro do organismo, prolongando-se até a extremidade posterior (HONIGBERG e BRUGEROLLE, 1990; PETRIN *et al.*, 1998). A pelta está presente na região anterior do corpo celular, a qual desempenha funções na sustentação e divisão da célula (BENCHIMOL, 2004). Os tricomonádídeos não possuem mitocôndria nem peroxissomos, mas apresentam uma importante e incomum organela, o hidrogenossomo, que apresenta funções metabólicas similares às mitocôndrias. Esta organela possui uma piruvato:ferredoxina oxidoreductase (PFOR) capaz de transformar o piruvato em acetato pela oxidação fermentativa e de liberar ATP e hidrogênio molecular (KULDA, 1999). Além do papel exercido no metabolismo energético do parasito, os hidrogenossomos são as organelas responsáveis pela ativação dos 5-nitroimidazóis, fármacos usados no tratamento da tricomonose (KULDA, 1999). Os hidrogenossomos são grânulos densos distribuídos por todo o citoplasma e

especialmente concentrados próximos ao axóstilo e à costa, apresentando alta atividade enzimática (MÜLLER, 1990; MÜLLER, 1993; BENCHIMOL, 2009).

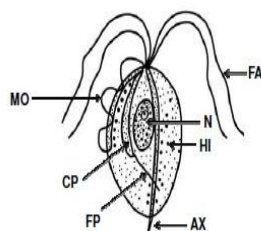


Figura 1. Morfologia do parasito *Trichomonas vaginalis*. AX – axóstilo, CP – corpo parabasal, FA – flagelos anteriores livres, FP – filamento parabasal, HI – hidrogenossomo, MO – membrana ondulante, N – núcleo. Adaptado: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/Trichomoniasis.htm>

O *T. vaginalis* é um micro-organismo que requer uma ampla quantidade de nutrientes para sua sobrevivência, dentre os quais carboidratos, aminoácidos, purinas e pirimidinas, ácidos graxos, vitaminas e sais inorgânicos são indispensáveis para o crescimento do parasito. Os carboidratos são a principal fonte de energia, sendo metabolizados, tanto no citoplasma como nos hidrogenossomos, sob condições anaeróbicas ou aeróbicas, formando ácidos orgânicos (LINDMARK e MÜLLER, 1973). Os produtos desse metabolismo incluem acetato, lactato, glicerol, CO₂, e em condições anaeróbicas, H₂ (MACK e MÜLLER, 1980; LINDMARK *et al.*, 1989). Os carboidratos são preferencialmente utilizados para a obtenção de energia, no entanto, quando ocorre privação destes, aminoácidos ou proteínas digeridas são utilizados para a manutenção do crescimento e sobrevivência do *T. vaginalis* (PETRIN *et al.*, 1998). O parasito é incapaz de sintetizar ácidos graxos e esterol, dependendo, de fontes exógenas desses nutrientes como meios de cultura contendo soro bovino, o qual contém os ácidos graxos requeridos pelo parasito (BEACH *et al.*, 1990; 1991). Além disso, o *T. vaginalis* não realiza síntese *de novo* de nucleotídeos púricos e pirimídicos. Um sistema de salvação altamente simples é utilizado para a aquisição de nucleosídeos ou bases púricas e pirimídicas (HEYWORTH *et al.*, 1982; 1984). Ele consiste em uma rota de duas enzimas: a purina nucleosídeo fosforilase (PNP, do inglês *Purine Nucleoside Phosphorylase*), a qual catalisa a interconversão entre bases e nucleosídeos púricos e a purina nucleosídeo quinase (PNK, do inglês *Purine Nucleoside Kinase*), a qual é capaz de converter nucleosídeos em nucleotídeos (MUNAGALA e WANG, 2003).

O *T. vaginalis* é um parasito obrigatório e incapaz de sintetizar *de novo* diversas macromoléculas. Além de purinas, pirimidinas e lipídeos, o parasito *T. vaginalis* requer para o crescimento vitaminas e sais inorgânicos. Considerando também que o metabolismo fermentativo do protozoário não é um processo de alto rendimento, o *T. vaginalis* é um organismo fastidioso, pois requer um ambiente rico em nutrientes para sobreviver (CUDMORE *et al.*, 2004). A obtenção destes nutrientes é realizada a partir das secreções vaginais ou através da fagocitose de células bacterianas ou do hospedeiro (HUGGINS e PETRI, 1981; PEREIRA-NEVES e BENCHIMOL, 2007). Dessa maneira, esses nutrientes, macromoléculas essenciais, vitaminas e minerais, além de soro, outra importante fonte nutricional para o crescimento dos tricomonadídeos, devem ser fornecidos no meio de cultura para garantir o máximo de crescimento e multiplicação destes parasitos (LINSTEAD, 1990).

I.3. Tricomonose

T. vaginalis é o agente etiológico da tricomonose, a doença sexualmente transmissível (DST) não viral mais comum no mundo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO), em 2008, o número de novos casos de Infecções Sexualmente Transmissíveis Curáveis (*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum* e *Trichomonas vaginalis*) em adultos entre 15 e 49 anos de idade, foi estimado em 498,9 milhões, sendo a incidência de *T. vaginalis* de 276,4 milhões (WHO, 2012). Em comparação com os dados apresentados pela OMS em 2005, ocorreu um crescimento de 11,2% de novos casos de *T. vaginalis* na população mundial em três anos. No entanto, é difícil obter números exatos devido à baixa sensibilidade dos métodos de diagnóstico empregados na rotina de laboratórios clínicos (PIPERAKI *et al.*, 2010), à falta de estudos de prevalência de qualidade, de detecção de isolados resistentes ao tratamento e à alta taxa de pacientes assintomáticos, fatos que levam à subestimação dos números apresentados, indicando que a incidência e prevalência desta infecção são muito mais elevadas (WHO, 2012; MILLER e NYIRJESY, 2011). A prevalência mundial estimada em 2008 para tricomonose é muito maior quando comparada à prevalência das demais DSTs avaliadas pela OMS. A prevalência estimada para infecção por *T. vaginalis* foi de 187 milhões, em comparação com 100,4 milhões por *C. trachomatis*, 36,4 milhões por *N. gonorrhoeae* e 36,4 milhões por *Treponema pallidum* (WHO, 2012).

Em mulheres, a infecção por *T. vaginalis* apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, variando desde apresentação assintomática até um estado de vaginite (MILLER e NYIRJESY, 2011). Cerca de um terço das pacientes infectadas são assintomáticas, no entanto, a maioria desenvolve sintomatologia acompanhada de comorbidades, como: vaginite, endometrite, adnexite, piossalpinge e associação positiva com vaginose bacteriana (FICHOROVA, 2009; PETRIN *et al.*, 1998). Na grande maioria das pacientes observa-se corrimento tipicamente amarelado ou esverdeado, espumoso e mucopurulento. Além disso, são observados sinais ou sintomas como irritação e prurido vulvar, pequenos pontos hemorrágicos na mucosa vaginal ou cervical acompanhados de edema e eritema, o que confere uma aparência conhecida como *colpitis macularis* ou aspecto de morango, dor abdominal inferior e disúria (MILLER e NYIRJESY, 2011; PETRIN *et al.*, 1998; SCHWEBKE e BURGESS, 2004). Os sintomas da tricomonose geralmente tornam-se piores durante ou imediatamente após o período menstrual, devido a maior disponibilidade de ferro, essencial para o crescimento e multiplicação do parasito (PETRIN *et al.*, 1998).

A prevalência e o panorama da doença no sexo masculino são bem menos caracterizados. Diferente das mulheres, homens infectados apresentam, na maioria dos casos, uma infecção autolimitada. A tricomonose é amplamente assintomática em homens, o que os torna carreadores do parasito, tornando-se importante o tratamento de parceiros de mulheres infectadas, para evitar a reinfecção (CUDMORE *et al.*, 2004). Os sintomas mais comuns em homens incluem corrimento uretral, prurido, disúria, aumento da frequência urinária e dor abdominal inferior (MILLER e NYIRJESY, 2011). A infecção é uma reconhecida causa de uretrite, representando 11% das uretrites não gonocócicas, além de estar associada a complicações como: prostatite, epididimite, balanopostite e infertilidade (CUDMORE *et al.*, 2004; KRIEGER *et al.*, 1993). Recentemente, estudos demonstraram uma associação positiva entre a infecção por *T. vaginalis* e o risco de câncer de próstata (SUTCLIFFE *et al.*, 2012). A presença de cátions de zinco nas secreções prostáticas, os quais são citotóxicos ao parasito, e a natureza oxidativa do trato genital masculino podem explicar a ocorrência transitória da infecção na maioria dos casos (CUDMORE *et al.*, 2004).

Ao contrário do que se observa em muitos casos, nos quais a infecção é facilmente tratada, a tricomonose pode causar sérias consequências à saúde, como complicações na gravidez (KLEBANOFF *et al.*, 2001), infertilidade (GOLDSTEIN *et al.*, 1993), predisposição ao câncer cervical (VIKKI *et al.*, 2000), doença inflamatória

pélvica (CHERPES *et al.*, 2006), parto prematuro e baixo peso de recém-nascidos (COTCH *et al.*, 1991; 1997). Além disso, a tricomonose é considerada um agente facilitador da transmissão e aquisição do HIV (QUINLIVAN *et al.*, 2012; SORVILLO *et al.*, 2001; VAN DER POL *et al.*, 2008). Os mecanismos dessa associação ainda não estão completamente elucidados, mas estudos apontam que os fatores que contribuem para a facilitação da aquisição do HIV pelo *T. vaginalis* incluem: (1) a resposta inflamatória na região genital, provocando infiltração leucocitária, com recrutamento de células alvo do HIV, como os linfócito CD4+ e macrófagos (QUINLIVAN *et al.*, 2012; LEVINE *et al.*, 1998) e o comprometimento da mucosa pelo parasito, com formação de pontos hemorrágicos, rompendo a barreira física ao vírus e permitindo o acesso à corrente sanguínea (QUINLIVAN *et al.*, 2012, BRAVO *et al.*, 2010; MC CLELLAND *et al.*, 2007); (2) a elevada carga viral encontrada nos compartimentos seminal e cérvico-vaginal; (3) a degradação do inibidor de protease leucocitária secretória, produto conhecido por bloquear o ataque viral à célula (QUINLIVAN *et al.*, 2012, BRAVO *et al.*, 2010); (4) a suscetibilidade aumentada para vaginose bacteriana ou colonização com outro patógeno não pertencente à microbiota vaginal normal, que por sua vez aumenta o risco de aquisição do HIV (QUINLIVAN *et al.*, 2012). Esses achados demonstram que medidas eficazes de diagnóstico e tratamento da tricomonose podem reduzir significativamente a transmissão do HIV.

Em relação ao diagnóstico da tricomonose, este não pode ser baseado somente na apresentação clínica, pois a infecção poderia ser confundida com outras DSTs, visto que sintomas clássicos da doença são observados em apenas 5 a 10% das mulheres (MACIEL *et al.*, 2004). Mulheres infectadas podem apresentar corrimento vaginal (59% das mulheres infectadas), odor fétido (36%) e prurido vaginal (33%); também pode ser observado o aumento do pH vaginal (82%) (MILLER e NYIRJESY, 2011). A investigação laboratorial é essencial no diagnóstico desta patogenia, permitindo diferenciar a tricomonose de outras DSTs (DE CARLI, 2007). Os métodos mais frequentemente empregados no diagnóstico da tricomonose apresentam relativamente baixa sensibilidade, como o exame direto a fresco e preparações coradas (LEHKER e ALDERETE, 2000). O método cultural é o padrão-ouro para o diagnóstico, apresentando alta sensibilidade. No entanto, são necessários alguns dias para a identificação do parasito, tempo durante o qual os pacientes infectados podem continuar a transmitir a infecção (DE CARLI, 2007). O advento da técnica de reação em cadeia a polimerase (PCR) tornou-se uma nova alternativa de diagnóstico (MACIEL *et al.*,

2004). A amplificação da sequência de DNA pela PCR tem sido largamente utilizada no diagnóstico de doenças infecciosas e seu uso no diagnóstico da tricomonose tem sido desenvolvido. Porém, devido ao seu alto custo, não são utilizados rotineiramente na prática clínica (MACIEL *et al.*, 2004; BRAVO *et al.*, 2010). Outros testes de diagnóstico modernos incluem o *OSOM Trichomonas Rapid Test* e sondas de ácido nucleico (BRAVO *et al.*, 2010).

Metronidazol e tinidazol, ambos pertencentes ao mesmo grupo, 5-nitroimidazóis, são os únicos fármacos recomendados pelo *Food and Drug Administration* (FDA, EUA) para o tratamento da tricomonose (DUARTE *et al.*, 2009), sendo o metronidazol o fármaco de escolha para esta infecção. O metronidazol é uma molécula pequena que atravessa a membrana da célula do *T. vaginalis* através de difusão passiva (CUDMORE *et al.*, 2004). O fármaco em si é inativo, um pró-fármaco, cujo grupamento nitro deve ser reduzido para exercer toxicidade ao parasito. A redução ocorre dentro das células ou organelas, como nos hidrogenossomos, pela ação da enzima piruvato:ferredoxina oxidoreductase (PFOR), resultando em intermediários radicais-nitro citotóxicos, os quais induzem quebras nas fitas de DNA, conduzindo a célula à morte (KULDA, 1999; CUDMORE *et al.*, 2004).

O metronidazol é um análogo sintético do antibiótico azomicina, derivado da bactéria *Streptomyces*. Desenvolvido em 1959, foi aprovado para o tratamento da tricomonose em 1960 e foi o primeiro fármaco a apresentar uma taxa de cura próxima a 100% com o tratamento sistêmico (CUDMORE *et al.*, 2004; DUREL *et al.*, 1967). Atualmente preconiza-se a administração do metronidazol em dose única de 2 g por via oral, mas também pode ser administrado em doses de 500 mg duas vezes ao dia, durante sete dias. Estas doses resultam em cura parasitológica em 85-95% dos pacientes (MILLER e NYIRJESY, 2011). Apesar de eficaz, o metronidazol apresenta uma série de efeitos adversos, como náuseas, vômitos, cefaleia, insônia, tontura, sonolência, boca seca e gosto metálico. Efeitos adversos mais graves são raros, mas incluem eosinofilia, leucopenia, palpitações, confusão mental e neuropatia periférica. Os efeitos colaterais são temporários e resolvidos com o fim do tratamento. Outro problema encontrado são os pacientes que apresentam uma reação de hipersensibilidade aos nitroimidazóis, caracterizada por rubor, febre, urticária, angiodema ou choque anafilático. Infelizmente, no caso da tricomonose, há poucas alternativas de tratamento para estes pacientes, uma vez que os únicos fármacos aprovados pelo FDA apresentam mecanismo de ação similar. Assim, o tratamento de escolha para pacientes com tricomonose e

hipersensibilidade aos nitroimidazóis é a dessensibilização, com doses crescentes do medicamento em curto espaço de tempo (MILLER e NYIRJESY, 2011; CUDMORE *et al.*, 2004; SCHWEBKE e BURGESS, 2004). O uso de metronidazol durante a gravidez tem sido amplamente debatido, pois este fármaco é capaz de atravessar a barreira placentária e já se mostrou ser mutagênico em bactérias e carcinogênico em ratos, de modo que sua teratogenicidade tem sido uma preocupação. Porém, até o momento, não foi possível estabelecer uma ligação entre a exposição ao metronidazol e problemas no nascimento, ou um possível risco ao feto. Este fato, juntamente com os riscos de complicações conhecidos da tricomonose durante a gravidez, tem levado médicos e pesquisadores a propor que os riscos para o feto de uma tricomonose materna são muito maiores do que os riscos relacionados à exposição ao metronidazol. O CDC recomenda o tratamento apropriado de qualquer mulher grávida diagnosticada com tricomonose, em qualquer fase da gravidez (MILLER e NYIRJESY, 2011; CUDMORE *et al.*, 2004; WHO, 2010).

Embora as taxas de cura sejam elevadas, falhas no tratamento podem ser observadas. Ao longo dos anos, têm ocorrido diversos relatos de falhas no tratamento da infecção por *T. vaginalis* e do surgimento de isolados resistentes ao metronidazol, e as evidências sugerem que a resistência pode estar aumentando (MILLER e NYIRJESY, 2011; SCHWEBKE e BARRIENTES, 2006). A prevalência de isolados resistentes parece variar amplamente, estando compreendida entre 2,2% e 9,6% (PÉREZ *et al.*, 2001; SCHWEBKE e BARRIENTES, 2006). A resistência do *T. vaginalis* ao metronidazol ocorre através de dois mecanismos: aeróbico e anaeróbico. A via aeróbica, em que a ferredoxina e as vias de eliminação de oxigênio são reguladas, é a mais relevante clinicamente, pois pode se desenvolver *in vivo* em doses terapêuticas de metronidazol, sem necessitar de uma exposição prolongada ao fármaco. Já a via anaeróbica envolve a regulação da PFOR e é observada principalmente *in vitro*, porém já há relatos na literatura de *T. vaginalis* com resistência anaeróbica isolados de paciente com tricomonose (VOOLMANN e BOREHAN, 1993). Estas vias enzimáticas estão envolvidas na ativação do metronidazol, logo, esta regulação impede que o fármaco se torne eficaz (MILLER e NYIRJESY, 2011; CUDMORE *et al.*, 2004).

A resistência de *T. vaginalis* ao metronidazol ocorre através de várias etapas com base na diminuição gradual e eventual perda da atividade de proteínas hidrogenossomais, envolvidas nas vias de ativação do fármaco. A liberação e transporte de elétrons necessários para a redução do grupamento nitro são inibidos e os radicais

microbicidas não são gerados (RASOLOSON *et al.*, 2002). Na resistência anaeróbica há uma redução ou ausência da atividade da PFOR e hidrogenases, com concomitante redução na produção de hidrogênio e mecanismos de remoção de oxigênio no hidrogenossomo. A PFOR e as hidrogenases podem agir protegendo o parasito dos produtos tóxicos derivados da redução do oxigênio (HARP *et al.*, 2011; CUDMORE *et al.*, 2004). Na resistência aeróbica, vias de remoção de oxigênio e a ferredoxina estão envolvidas. Uma vez que o oxigênio é um receptor de elétrons altamente eficaz, o aumento nos níveis de oxigênio no hidrogenossomo prejudica a redução e ativação do metronidazol, pois ocorre uma competição entre o metronidazol e o oxigênio por elétrons (HARP *et al.*, 2011; DUNNE *et al.*, 2003). Se o metronidazol não for reduzido, a concentração do fármaco nos ambientes intra e extracelulares é a mesma, não havendo um gradiente de concentração do fármaco através da membrana plasmática, não permitindo a entrada do metronidazol na célula (HARP *et al.*, 2011; ALI e NOZAKI, 2007). Além disso, o radical nitro reduzido livre é oxidado de volta ao composto original pelo oxigênio e por sua vez produz um ânion superóxido. Este processo é conhecido como ciclo fútil e resulta apenas em danos limitados às células, através do ânion superóxido, em comparação à morte celular devido a radicais nitro reativos (HARP *et al.*, 2011; ALI e NOZAKI, 2007).

A regulação da função hidrogenossomal não é a única mudança observada nos isolados resistentes ao metronidazol, alterações morfológicas também podem ocorrer. Dunne e colaboradores (2003) demonstraram que a adesão a tubos de cultura e placas de 96 poços é dramaticamente aumentada, para quase 100%, nas linhagens resistentes ao metronidazol. Outro mecanismo proposto para a resistência de isolados de *T. vaginalis* a este fármaco é a infecção intracelular do parasito com *Mycoplasma hominis* (XIAO *et al.*, 2006), no entanto, mais estudos são necessários para comprovar esta relação. Atualmente os mecanismos metabólicos que dão origem à tricomonose resistente ao metronidazol, tanto na prática clínica como *in vitro*, não estão completamente elucidados pelos modelos de resistência aeróbica e anaeróbica, e as evidências sugerem que os dois mecanismos não se excluem mutuamente (ALI e NOZAKI, 2007).

Considerando o sério impacto da tricomonose na saúde pública, a terapia bastante limitada, o crescente número de casos de resistência e a complexidade dos mecanismos envolvidos na interação parasito-hospedeiro, torna-se evidente a necessidade de investigação dos processos envolvidos na sobrevivência, fatores de virulência e resistência do parasito buscando o melhor entendimento dos mecanismos

envolvidos na infecção e patogênese da tricomonose, contribuindo desta forma, para o estudo de novos alvos terapêuticos e influenciando a profilaxia e conduta terapêutica.

I.3.1. Mecanismos de Patogenicidade

Apesar de o parasito ter sido descrito por Donné em 1836 (HONIGBERG, 1990) e do cultivo *in vitro* ter sido iniciado em 1920 (LINSTEAD, 1990), muitos aspectos biológicos do protozoário ainda são desconhecidos, o que revela a complexidade dos mecanismos utilizados pelo patógeno para a sobrevivência. Embora os aspectos que envolvem a patogenicidade do *T. vaginalis* não estejam completamente elucidados, o sucesso na colonização da mucosa e manutenção da infecção é favorecido pela existência de diversos mecanismos de virulência (FIGUEROA-ÂNGULO *et al.*, 2012). A interação parasito-hospedeiro é um processo complexo no qual estão envolvidos componentes associados à superfície celular do parasito e células epiteliais do hospedeiro e, ainda, componentes solúveis encontrados nas secreções vaginal e uretral (BRAVO *et al.*, 2010).

A citoaderência do parasito é um processo chave para o estabelecimento e manutenção da infecção crônica de *T. vaginalis*. É um processo complexo que envolve não apenas as proteínas de superfície (adesinas) e glicoconjugados, mas também proteínas do citoesqueleto (FIGUEROA-ÂNGULO *et al.*, 2012). As adesinas ou proteínas de adesão, AP120, AP65, AP51, AP33 e AP23 (ENGBRING e ALDERETE, 1998; KUCKNOOR *et al.*, 2005; MORENO-BRITO *et al.*, 2005), são expressas por famílias multigenes e foram identificadas e caracterizadas como proteínas multifuncionais, com funções diferentes dependendo da localização (ALDERETE *et al.*, 2001).

A citotoxicidade é um processo iniciado com a citoaderência do parasito e envolve uma cascata de eventos que resultam na citólise, fagocitose, e desintegração de monocamadas de células (FIGUEROA-ÂNGULO *et al.*, 2012). Além disso, produtos secretados e liberados pelo *T. vaginalis*, como glicosidases e CDF (do inglês, *Cell-Detaching Factor*), são altamente citotóxicos às CEVHs. A severidade dos sintomas e sinais da tricomonose pode ser relacionada com os níveis de CDF, demonstrando a importância deste na patogenicidade da tricomonose (MACIEL *et al.*, 2004).

Após atingir o sucesso em colonizar a mucosa vaginal, o parasito é capaz de sobreviver durante muito tempo neste ambiente hostil, tipicamente ácido e repleto de fatores imunes microbicidas. Entretanto, para continuar exercendo o parasitismo, o *T. vaginalis* depende de mecanismos de aquisição de nutrientes e de evasão do sistema imune do hospedeiro. A fagocitose é o principal mecanismo de aquisição de nutrientes, e apesar deste mecanismo não estar totalmente elucidado, dois mecanismos diferentes são observados, um com a formação de pseudópodes em direção à célula alvo, e o outro através de um processo de afundamento, sem extensão da membrana (FIGUEROA-ÂNGULO *et al.*, 2012). Os trofozoítos são capazes de ingerir e degradar com eficiência bacilos de Döderlein, CEVHs e células epiteliais cervicais, leucócitos, eritrócitos, leveduras, espermatozoides e células prostáticas, adquirindo desta forma ferro, lipídeos, nucleotídeos/nucleosídeos, dentre outros nutrientes importantes para o seu metabolismo (PEREIRA-NEVES *et al.*, 2007; FIGUEROA-ÂNGULO *et al.*, 2012).

Devido às constantes mudanças no ambiente vaginal durante o ciclo menstrual e para manter uma infecção vaginal crônica, o *T. vaginalis* dispõe de diversos mecanismos de evasão do sistema imune. Dentre eles estão: (1) secreção de proteases que degradam imunoglobulinas humanas (IgG, IgM, IgA) (HERNANDEZ-GUTIERREZ *et al.*, 2004); (2) mimetismo molecular, através do revestimento da superfície celular do parasito com proteínas e macromoléculas do próprio hospedeiro, evitando assim, o reconhecimento dos trofozoítos como componentes estranhos pelo sistema imunológico (PETERSON e ALDERETE, 1982); (3) variação fenotípica, com a alternância da expressão de antígenos na superfície, através da participação de dois imunógenos de superfície, P230 e P270. Para a glicoproteína P230 a variação fenotípica é baseada em mudanças no epítopo de ligação do anticorpo, estando sempre presente. Em contraste, a expressão da glicoproteína P270 está relacionada à presença de um vírus de dsRNA, à concentração de ferro e à fosforilação (LENKER e ALDERETE, 2000; ALDERETE, 1999; FIGUEROA-ÂNGULO *et al.*, 2012); (4) secreção contínua de grandes quantidades de proteínas solúveis altamente imunogênicas, para neutralizar a defesa específica anti-*T. vaginalis* de anticorpos e linfócitos T citotóxicos, dentre outros processos de evasão (LENKER e ALDERETE, 2000); (5) controle e destruição das células imunes do hospedeiro, por indução à apoptose de neutrófilos e macrófagos (KANG *et al.*, 2006); (6) degradação das proteínas do complemento, via CPs, reguladas por altas concentrações de ferro, durante o período menstrual (ALDERETE *et al.*, 2001).

I.3.2. *Trichomonas vaginalis* e *Mycoplasma hominis*

Mycoplasma hominis é uma espécie bacteriana desprovida de parede celular rígida, frequentemente encontrada no trato genital inferior. São os menores organismos auto-replicantes, apresentando um genoma de tamanho limitado, o que lhe confere uma forte dependência às células hospedeiras (VANCINI e BENCHIMOL *et al.*, 2008., BUTLER *et al.*, 2010; PASCUAL *et al.*, 2010).

A presença de endossimbiontes em protozoários de vida livre é descrita com frequência, mas não havia relato desta relação em protozoários parasitos obrigatórios. O primeiro exemplo descrito de simbiose envolvendo patógeno humano foi entre *Legionella pneumophila*, um agente patogênico bacteriano, e *Acanthamoeba* sp., um patógeno oportunista de vida livre (ROWBOTHAM *et al.*, 1980). O papel dos protozoários como vetores para transmissão de doenças humanas tem recebido pouca atenção, no entanto, o interesse aumentou após a constatação de que relações simbióticas entre protozoários e bactérias podem exercer uma forte influência sobre a patogênese de um ou ambos os micro-organismos (ROWBOTHAM *et al.*, 1980; CIRILLO *et al.*, 1999; DESSI *et al.*, 2005).

A existência de uma relação simbiótica entre *T. vaginalis* e *M. hominis* é o primeiro exemplo relatado de simbiose entre dois patógenos humanos obrigatórios. Esta associação é estritamente espécie-específica, uma vez que não é observada com *Ureaplasma urealyticum* ou com outras espécies de Mollicutes que são habitantes mais comuns do trato genital humano (DESSI *et al.*, 2005). O primeiro relato de infecção de *T. vaginalis* com *M. hominis* ocorreu em 1975 (NIELSEN e NIELSEN, 1975).

As taxas de isolados de *T. vaginalis* infectados por *M. hominis* descritas na literatura variam entre 20% a mais de 90%, demonstrando uma ampla variação entre os estudos (RAPPELLI *et al.*, 1998; HAMPL *et al.*, 2001.; VAN BELKUM *et al.*, 2001; VAN DER SCHEE *et al.*, 2001; FANG *et al.*, 2006; XIAO *et al.*, 2006; BUTLER *et al.*, 2010). *M. hominis* tem a capacidade de penetrar nas células de *T. vaginalis* por endocitose e se replicar no interior do protozoário (DESSI *et al.*, 2005; VANCINI E BENCHIMOL, 2008). Estes achados sugerem que a simbiose pode proporcionar um nicho protegido para a sobrevivência de *M. hominis* durante a infecção humana, o que ajuda a explicar a capacidade da bactéria em persistir no ambiente adverso do trato vaginal, com a capacidade de resistir a estresses ambientais, como o mecanismo de

defesa do hospedeiro e as terapias farmacológicas (DESSI *et al.*, 2005). A transmissão de *M. hominis* de um indivíduo para outro também pode ser facilitada pela sua capacidade de sobreviver no interior do *T. vaginalis* (XIAO *et al.*, 2006).

A presença de *M. hominis*, em associação com *T. vaginalis* tem importantes implicações clínicas. Curiosamente, ambas as infecções estão associadas com complicações na gravidez e várias complicações pós-parto, incluindo parto prematuro e baixo peso de recém-nascidos (CASSEL *et al.*, 1991; COTCH *et al.*, 1997; PAUL *et al.*, 1998). Dessi e colaboradores (2005) sugeriram que complicações mais graves podem ocorrer devido às ações sinérgicas das duas infecções. Além disso, o aumento da citopatogenicidade às células epiteliais em parasitos infectados com *M. hominis* tem sido demonstrado (VANCINI e BENCHIMOL, 2008).

Alguns autores tem investigado a correlação entre a infecção de *T. vaginalis* com *M. hominis* e o polimorfismo genético de isolados do parasito usando ferramentas moleculares, especialmente com a técnica de RAPD (HAMPL *et al.*, 2001; XIAO *et al.*, 2006). Os resultados destes estudos sugerem a possibilidade de uma predisposição genética de isolados de *T. vaginalis* à entrada bacteriana e/ou sua sobrevivência (FRAGA *et al.*, 2012). *M. hominis* entra na célula do *T. vaginalis* através de um processo de endocitose, sendo três tipos diferentes de internalização observados: (1) um processo de “afundamento”, sem qualquer participação aparente de extensões da membrana plasmática do tipo pseudópodes, onde várias bactérias são simultaneamente ingeridas; (2) incorporação de uma única bactéria através de um “poço revestido” e (3) a internalização de bactérias inseridas na membrana por uma estrutura terminal polar (VANCINI E BENCHIMOL, 2008).

Embora seja bem conhecido que o metronidazol requer modificações nos hidrogenossomos de *T. vaginalis* para tornar-se ativo e citotóxico ao parasito (TERRA e JOHNSON, 1999), os mecanismos de resistência ao metronidazol ainda não são bem compreendidos (XIAO *et al.*, 2006; ALI e NOZAKI, 2007). Um mecanismo proposto para a resistência de isolados de *T. vaginalis* a este fármaco é a infecção intracelular do parasito com *M. hominis*. Xiao e colaboradores (2006) demonstraram esta relação em um estudo com 28 isolados obtidos de hospitais da cidade de Guangzhou, na China. Porém, Butler e colaboradores (2010) não encontraram associação entre a presença de *M. hominis* e a resistência ao metronidazol em um estudo utilizando 55 isolados de *T. vaginalis* selecionados do CDC (Centers for Disease Control and Prevention/USA). Os resultados contraditórios apresentados por estes dois estudos podem ser justificados

pelas diferenças existentes entre as cepas de *M. hominis* e a quantidade de *M. hominis* que infectam o *T. vaginalis* (XIAO *et al.*, 2008; RAPPELLI *et al.*, 2001). Assim, é possível que isolados de *T. vaginalis* infectados com certos tipos de *M. hominis* ou que tenham mais células bacterianas por parasito apresentem maior nível de resistência (BUTLER *et al.*, 2010). Porém, se a infecção de *T. vaginalis* com *M. hominis* contribuísse para a sua resistência, antibióticos específicos para *Mycoplasma* co-administrados com os 5-nitroimidazóis poderiam ter um efeito benéfico, além disso, a utilização de uma técnica de PCR para detecção de *M. hominis* poderia ser uma ferramenta rápida de detecção de tricomonose resistente aos 5-nitroimidazóis (BUTLER *et al.*, 2010).

I.3.3. *Trichomonas vaginalis* e Trichomonasvirus (TVVs)

A presença de moléculas de dsRNA (do inglês *double strand RNA*) em isolados de *T. vaginalis* foi relatada pela primeira vez em 1985, seguida pela comprovação de sua associação com partículas semelhantes a vírus (WANG e WANG, 1985, 1986).

Vírus de dsRNA similares aos TVVs ou partículas semelhantes a vírus (VLPs, do inglês *virus-like proteins*) têm sido encontrados em vários outros protozoários, incluindo *Cryptosporidium parvum* (KNIEL *et al.*, 2004), *Giardia lamblia* (WANG *et al.*, 1993) e *Leishmania braziliensis* (WIDMER *et al.*, 1989). Numerosos isolados clínicos de *T. vaginalis* são persistentemente infectados com vírus dsRNA (WANG e WANG, 1986; KHOSHANAN e ALDERETE, 1993). Estudos demonstram que aproximadamente metade de todos os isolados de *T. vaginalis* são infectadas com vírus de dsRNA ou VLPs (GERHOLD *et al.*, 2009), porém, a taxa de infecção pode variar de acordo com a localização geográfica. Taxas elevadas de infecção foram observadas em isolados da África do Sul e Baltimore, 82 e 75%, respectivamente (WEBER *et al.*, 2003; WENDEL *et al.*, 2002). Em estudos realizados com isolados de Cuba e EUA as taxas foram próximas de 50%, 55 e 50%, respectivamente (FRAGA *et al.*, 2005; SNIPES *et al.*, 2000). Já um estudo realizado na Coreia encontrou apenas 13,6% dos isolados infectados com TVVs (KIM *et al.*, 2007), demonstrando a variabilidade na prevalência desta infecção.

Através de sequenciamento genômico e análises filogenéticas de diversos TVVs, que demonstraram homologia destes vírus com os vírus da dsRNA monossegmentados

da família Totiviridae (SU e TAI, 1996; BESSARAB *et al.*, 2000), foi possível classificá-los como um novo gênero desta família da qual já fazem parte os gêneros *Giardiavirus*, *Leishmanivirus*, *Totivirus* e *Victorivirus*. Os membros desta família são caracterizados como partículas icosaédricas, monosegmentadas, com diâmetro variando entre 30 e 40 nm (GHABRIAL, 2008).

O genoma de cada TVV é uma molécula única de dsRNA, com cerca de 4.500 a 5.000 bp, que codifica uma proteína da cápsula viral (CP) e uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (GOODMAN *et al.*, 2011a). Estudos revelaram que a presença de mais de três segmentos de dsRNA de comprimento similar (4.000-5.000 bp) poderiam ser identificados em um único isolado, sugerindo a presença de um vírus multissegmentar ou a possibilidade de infecção mista, por diversos TVVs (FLEGR *et al.*, 1988; KHOSHANAN e ALDERETE, 1993). Estudos subsequentes demonstraram a presença de coinfeção com distintos TVVs em um único isolado de *T. vaginalis*. Até o momento quatro espécies de TVVs foram identificadas, sendo a quarta espécie descrita recentemente (GOODMAN *et al.*, 2011b). Além disso, pequenas moléculas de dsRNA de 500 a 1700 bp de comprimento podem ser isoladas a partir de alguns *T. vaginalis* infectados com TVVs, que provavelmente representam dsRNAs satélites (GOODMAN *et al.*, 2011a).

Como a maioria dos outros membros da família Totiviridae, os TVVs não demonstram capacidade de transmissão extracelular e provavelmente não possuem maquinaria molecular para sair ou entrar na célula de seu hospedeiro. Em vez disso, eles são transmitidos verticalmente durante a divisão celular mitótica, ou seja, durante a reprodução assexuada de trofozoítos de *T. vaginalis*, por fissão binária (SCHWEBKE e BURGESS, 2004; GOODMAN *et al.*, 2011a).

Foi demonstrado que a presença de vírus dsRNA ou VLPs dentro de *T. vaginalis* alteram a expressão de uma proteína de superfície altamente imunogênica, a P270, além disso, variações fenotípicas nos protozoários e regulação de determinadas proteínas, como cisteína proteases, também têm sido demonstradas (ALDERETE *et al.* 1986; WANG *et al.* 1987; PROVENZANO *et al.* 1997; ALDERETE 1999). Cisteína proteases são conhecidos fatores de virulência de *T. vaginalis*, responsáveis pela degradação de uma série de proteínas do sistema imune, tais como proteínas do complemento e imunoglobulinas, e também estão envolvidas na citoaderência (PROVENZANO e ALDERETE, 1995; ALDERETE *et al.*, 1995; ARROYO e ALDERETE, 1989). Sendo assim, a infecção de isolados de *T. vaginalis* por TVVs

poderia muito possivelmente modular a patogenicidade de *T. vaginalis* à mucosa do trato genital humano. Além disso, diferenças na sintomatologia, resistência aos fármacos e transmissibilidade também poderiam estar envolvidos (GOODMAN *et al.*, 2011a; GOODMAN *et al.*, 2011b).

Embora a importância da presença de TVVs na virulência e patogenicidade de *T. vaginalis* ainda permaneça desconhecida, é importante ressaltar a possibilidade deste protozoário estar atuando como um vetor de agentes infecciosos (BENCHIMOL *et al.*, 2002). Apesar das funções exatas dos vírus dsRNA e VLPs não serem conhecidas, a associação de regulação de proteínas e mudança fenotípica com a infecção pelo vírus sugerem que a presença intracelular de TVVs pode estar associada com a virulência de *T. vaginalis* (GERHOLD *et al.*, 2009).

I.4. *Candida* spp.

Candida é um fungo leveduriforme membro do reino Fungi, da ordem Saccharomycetales, da classe Saccharomycetes e da família Mitosporic Saccharomycetales (BIALKOVÁ e SUBIK, 2006). Algumas espécies de leveduras deste gênero podem fazer parte da microbiota normal da pele, cavidade oral, trato gastrointestinal e geniturinário de indivíduos saudáveis, permanecendo neste habitat como colonizantes (CAMARGO *et al.*, 2008; SENEVIRATNE *et al.*, 2008).

As espécies de *Candida* podem reproduzir-se por gemulação, dando à célula uma forma oval (característica das leveduras), também chamada de blastóporo ou blastoconídeo. No entanto, este micro-organismo tem característica de dimorfismo, podendo crescer também sob a forma filamentosa através da produção de tubos germinativos, resultando numa conversão da forma de levedura para um crescimento em forma de micélio, com produção de hifas e pseudo-hifas. Estas estruturas são invasivas e penetram nos tecidos do hospedeiro, sendo o primeiro passo para a infecção. Este gênero tem também a capacidade de produzir, sob condições menos favoráveis, clamidósporos, que são estruturas esféricas que apresentam uma parede celular densa e citoplasma condensado, e que se formam em resposta a mudanças de condições ambientais, permitindo que a levedura se adapte a diferentes nichos ecológicos, sendo conhecidas como estruturas de resistência deste patógeno (BROWN, 2003; CHAFFIN *et al.*, 1998).

Este gênero é composto por cerca de 200 espécies, das quais 20 são reconhecidamente patogênicas ao homem, incluindo *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* e *C. dubliniensis* (RIBEIRO *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2011).

A candidíase é na maioria das vezes de origem endógena, ocorrendo como consequência de um distúrbio imunológico do hospedeiro e dos fatores de virulência destas leveduras, que possuem habilidade de colonizar, penetrar e invadir o tecido (BROWN *et al.*, 2007, HOLLENBACH 2008). Dentre as espécies do gênero *Candida*, *Candida albicans* tem sido relatada como a mais prevalente, seguida de *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (LU *et al.*, 2004; ODDS *et al.*, 2006; PFALLER e DIEKEMA 2007; PANIZO *et al.*, 2009). Embora a *C. albicans* seja a espécie mais comumente isolada nos casos de candidúria, a detecção de isolados de *Candida* não-*albicans*, muitas vezes consideradas espécies emergentes, vem se tornando cada vez mais frequente, o que requer uma atenção especial na precisão da metodologia de identificação (RODRIGUES *et al.*, 2011).

Há uma ampla variedade de métodos utilizados para a detecção de *Candida* spp., sendo o ágar Sabouraud Dextrose o meio de cultura de escolha para o isolamento de leveduras deste gênero (RIBEIRO *et al.*, 2009). Neste meio de cultura as colônias apresentam coloração branca ou branco-amarelada e outras características micromorfológicas muito semelhantes entre as espécies, como a aparência e o odor, sendo necessários métodos alternativos para a identificação, como os testes bioquímicos ou o microcultivo em lâmina, que possibilita diferenciar as espécies de *Candida* através da observação da disposição dos blastoconídios, pseudo-hifas e clamidoconídios (WILLIAMS e LEWIS *et al.*, 2000).

A identificação por métodos convencionais é trabalhosa e requer longo período de tempo (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Para minimizar o tempo desses procedimentos, vários meios seletivos diferenciais cromogênicos para identificação presuntiva das amostras de *Candida* foram desenvolvidos. Esses meios contêm substratos que reagem com enzimas secretadas pelos fungos produzindo colônias com várias pigmentações (OLIVEIRA *et al.*, 2006). O meio de cultura CHROMagar se baseia na utilização do substrato β -glicosaminidase (COOKE *et al.*, 2002) e diferencia as leveduras de acordo com a morfologia e a cor das colônias (CARRILLO-MUNÓZ *et al.*, 2001), apresentando alta sensibilidade e especificidade na diferenciação de espécies de

Candida (RAD *et al.*, 2011). A utilização deste meio facilita a detecção e a identificação destas leveduras, fornecendo resultados presuntivos em menor tempo que os obtidos pelos métodos já padronizados (ARAUJO *et al.*, 2005). O BIGGY Agar é outro meio cromogênico utilizado na diferenciação presuntiva de leveduras. Contém sulfito de bismuto, que permite ao fungo se desenvolver e produzir colônias de cor preta devido à redução extracelular em sulfureto de bismuto. No entanto, apresenta menor especificidade, o que limita seu uso no diagnóstico clínico, pois algumas espécies apresentam colorações similares, dificultando a identificação (YÜCESOY e MAROL, 2003).

A identificação rápida e correta das espécies é de suma importância para o estabelecimento de uma terapia mais adequada, principalmente porque existem diferenças entre as espécies quanto à suscetibilidade a determinados antifúngicos (MASSONET, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2006). Métodos bioquímicos e moleculares, que permitem a identificação em algumas horas, foram desenvolvidos e estão sendo avaliados. Métodos automatizados como o sistema VITEK2 (BioMérieux) e API *Candida* systems (BioMérieux) que utilizam a fluorescência para monitorar reações metabólicas em um cartão de identificação (YST), podem reduzir o tempo de identificação para apenas 15 horas (GRAF *et al.*, 2000; MASSONET, 2004; CAMPBELL *et al.*, 1999).

I.5.Candidúria

A presença de fungos leveduriformes no exame direto de urina, através da presença de pseudo-hifas e do crescimento do fungo no cultivo de urina, pode ser definida como candidúria (MALANI e KAUFFMAN *et al.*, 2007). No entanto, este achado não envolve necessariamente sinais e/ou sintomas de infecção urinária no indivíduo, podendo, em muitos casos, ser apenas contaminação no procedimento de coleta da urina. Porém, é necessária cuidadosa avaliação, uma vez que este achado laboratorial pode representar candidúria assintomática, cistite, uretrite, pielonefrite, candidíase renal primária, bola fúngica ureteropélvica e até candidíase disseminada (COLOMBO e GUIMARÃES *et al.*, 2007; ACHKAR e FRIES, 2010). A maioria dos pacientes com candidúria são assintomáticos, no entanto, em infecções sintomáticas, os sintomas são indistinguíveis de infecções urinárias bacterianas (KAUFFMAN *et al.*, 2005).

C. albicans é considerada a principal espécie fúngica isolada do trato urinário, sendo responsável por, aproximadamente, 70% dos casos clínicos, seguido de espécies como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Apesar do predomínio de *C. albicans*, tem se tornado cada vez mais frequente a detecção de isolados de *Candida* não-*albicans*, que são consideradas espécies emergentes, o que requer maior precisão da metodologia de identificação (RODRIGUES *et al.*, 2011). Todas as espécies comuns de *Candida* são capazes de causar infecções do trato urinário (ITUs), e em diversos centros do mundo as espécies de *Candida* não-*albicans* já se tornaram predominantes (SOBEL *et al.*, 2011).

A candidúria raramente está presente em indivíduos saudáveis, sendo um achado clínico comum em pessoas idosas e pacientes hospitalizados, especialmente aqueles em unidades de terapia intensiva (UTI), que apresentam frequentemente múltiplos fatores predisponentes (SOBEL *et al.*, 2011). Um segundo grupo de pacientes de risco é o de recém-nascidos, principalmente aqueles que recebem terapia antimicrobiana prolongada. O gênero *Candida* é o patógeno mais frequentemente isolado em infecções nosocomiais do trato urinário (ACHKAR e FRIES, 2010; SOBEL *et al.*, 2011).

Os fatores predisponentes para candidúria incluem diabetes *mellitus*, transplante renal, utilização de cateter urinário, sexo feminino, concomitante bacteriúria, hospitalização prolongada, anomalias congênitas do trato urinário, internação em unidade de terapia intensiva, anormalidades estruturais do trato urinário, uso de antibióticos de amplo espectro, disfunção da bexiga, estase urinária e nefrolitíase (FISHER *et al.*, 2011). O cateterismo é considerado um fator de risco para a candidúria pois, durante o processo de colocação no trato urinário pode ocorrer a introdução do agente patogênico, além disso, este procedimento pode permitir a migração do micro-organismo para a bexiga através da superfície externa do cateter na região periuretral (KAUFFMAN *et al.*, 2005).

O diagnóstico da candidúria é bastante problemático, uma vez que é necessário determinar quando a presença de *Candida* na amostra de urina representa de fato uma infecção do trato urinário ou se, simplesmente, é uma colonização ou contaminação no momento da coleta (RODRIGUES *et al.*, 2011). A contaminação da urina ocorre principalmente em duas situações: quando a coleta não foi realizada de forma adequada, o que ocorre com frequência em pacientes cateterizados, e em mulheres que apresentam elevada colonização de *Candida* na região vulvovaginal (CANUTO e RODERO, 2012). Em decorrência a este fato, para cultura de urina, recomenda-se a coleta de jato médio

após higienização adequada da glândula ou vagina. Em pacientes com sonda vesical de demora, amostra de urina deve ser colhida por punção a ser realizada no local específico do circuito para esta finalidade, sempre precedido por assepsia adequada, procurando desta maneira, diminuir a contaminação no momento da coleta (COLOMBO e GUIMARÃES *et al.*, 2007).

O primeiro indício de que uma infecção fúngica está presente pode ser a constatação de leveduras visualizadas por microscopia (KAUFFMAN *et al.*, 2011). Na urina, *Candida albicans* e outras espécies menos comuns, como *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*, aparecerão como leveduras, de 4-10 µm de diâmetro e muitas vezes mostram formação de elementos de hifas (KAUFFMAN *et al.*, 2011). Leveduras menores, com apenas 2-4 µm de diâmetro, sem quaisquer estruturas de hifas, são provavelmente *C. glabrata* (KAUFFMAN *et al.*, 2011).

Atualmente, não há critérios padronizados para a diferenciação de infecção e colonização. Para alguns, a simples presença de leveduras em uroculturas ou no exame direto já são critérios suficientes para definir infecção. No entanto, em alguns estudos, um dos critérios para se obter a definição é a quantificação, porém um valor padrão ainda não foi estabelecido. Para alguns autores, a contagem de 1.000 UFC/mL é satisfatória para o diagnóstico de candidúria, enquanto, para outros, este valor pode ser igual ou superior a 10.000 UFC/mL (GULER e URAL *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2011). A presença de pseudo-hifas já foi considerada um critério de diferenciação entre infecção e colonização, entretanto, algumas espécies patogênicas de *Candida*, como *C. glabrata*, não desenvolvem esta morfologia em condições de patogenicidade, mas claramente são capazes de causar ITUs, logo, este achado não é relevante para o diagnóstico desta infecção (KAUFFMAN *et al.*, 2011).

Devido às dificuldades enfrentadas no diagnóstico da candidúria, considerando o valor limitado da quantificação da cultura de urina, outros parâmetros têm sido utilizados para auxiliar o diagnóstico. Dentre eles estão a presença de hemácias e leucócitos no sedimento urinário, assim como leveduras, pseudo-hifas e debris necróticos. No entanto, a ausência de alterações no sedimento urinário não elimina a possibilidade de infecção fúngica (MALANI e KAUFFMAN, 2007).

A presença de leveduras na urina, se microscopicamente visualizado ou obtidas em cultura, deve ser avaliada no contexto do ambiente clínico para determinar a sua relevância e tomar uma decisão adequada sobre a necessidade de tratamento com antifúngico (ACHKAR e FRIES, 2010). O fluconazol tem sido a droga antifúngica de

escolha na terapêutica de pacientes sintomáticos, desde que a espécie isolada não seja *C. glabrata* ou *C. krusei*. O tratamento com fluconazol, 200 mg/dia, por 7-14 dias, tem resultado em eficácia terapêutica (HOLLENCACH, 2008; SOBEL *et al.*, 2000). O sucesso do tratamento de pacientes com candidúria com este fármaco está relacionado à alta concentração da droga ativa na urina e a menor probabilidade de proporcionar resistência durante a terapia, além disso, é uma alternativa menos tóxica que a anfotericina B para o tratamento de infecções oportunistas por *Candida*. Os principais problemas do uso deste fármaco estão relacionados à resistência intrínseca de algumas espécies de *Candida*, como *C. glabrata* e *C. krusei*, o que limita sua utilização nas infecções por estes patógenos (KAUFFMAN *et al.*, 2005; HOLLENCACH, 2008). Os antifúngicos da classe das equinocandinas, também são uma alternativa no tratamento, possuem poucos efeitos colaterais, entretanto são pouco excretados pelos rins e somente níveis sub-terapêuticos são alcançados na urina (DENNING *et al.*, 2003; ACHKAR e FRIES, 2010).

O guia da Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA) recomenda o tratamento da candidúria para recém-nascidos de baixo peso, pacientes neutropênicos, pacientes submetidos a transplante renal ou aqueles com indicação de manipulação invasiva ou cirúrgica de vias urinárias, mesmo na ausência de sintomas e obviamente, nos pacientes sintomáticos (COLOMBO e GUIMARÃES *et al.*, 2007).

I.5.1. Mecanismos de patogenicidade

Embora seja geralmente assumido que a transição da colonização assintomática à candidíase sintomática ocorra após uma perturbação ou perda de mecanismos de defesa local, esta transição também pode ocorrer devido a fatores que aumentam a virulência do fungo (CASSONE *et al.*, 2007; JAYATILAKE, 2011). O poder patogênico da *Candida* spp. depende de fatores de virulência como a capacidade de crescer à temperatura de 37°C, a qual permite um bom desenvolvimento no corpo humano; a formação de hifas e pseudohifas, as quais representam um obstáculo para a fagocitose e permitem a fixação da levedura nos epitélios; a produção de fosfolipases e proteinases que, além de facilitar o fornecimento de nutrientes, estão envolvidas na aderência da levedura à mucosa do hospedeiro e invasão fúngica (CAMARGO *et al.*, 2008; JAYATILAKE, 2011).

A capacidade de se adaptar a uma variedade de habitats diferentes e a formação de biofilmes também são sugeridas como importantes fatores de virulência deste fungo (SILVA *et al.*, 2010). A formação de biofilmes por *Candida* apresenta importantes repercussões clínicas devido ao aumento da resistência à terapia antifúngica e da capacidade das células em biofilmes resistirem às defesas imunes do hospedeiro (RAMAGE *et al.*, 2005; UPPULURI *et al.*, 2009; ESTIVILL *et al.*, 2011), limitando a penetração de substâncias e células inflamatórias através da matriz (ESTIVILL *et al.*, 2011).

1.5.2. Biofilme

O biofilme de *Candida* pode ser definido como uma comunidade de células bem estruturada, embebida em uma matriz extracelular polimérica e aderente a uma superfície biótica ou abiótica, formando uma estrutura tridimensional (BLANKENSHIP e MITCHELL, 2006). Estas células se aderem inicialmente à superfície, que pode ser a mucosa ou um dispositivo médico e após começam a produzir a matriz extracelular polimérica (MEP). As principais vantagens dos micro-organismos se organizarem em comunidades consistem na maior facilidade de aquisição de nutrientes, favorecendo um crescimento mais ordenado da comunidade e uma maior proteção contra radiações UV, fagocitose, desidratação e resistência a antimicrobianos (SENEVIRATNE, 2008).

Um biofilme tipicamente se desenvolve ao longo de etapas sequenciais: na fase inicial ocorre a adesão da célula planctônica na forma de levedura à superfície do substrato, sendo esta aproximação aleatória ou atraída por quimiotaxia. A produção de adesinas pela levedura e a aderência de plaquetas e fibrinas do hospedeiro no substrato são fatores que auxiliam na adesão primária. Na fase secundária, ocorre a proliferação das células aderidas, com a formação de microcolônias e organização celular, e a matriz extracelular começa a ser produzida. Esta fase envolve o aparecimento de mecanismos de comunicação intercelulares que levam a expressão diferencial de genes, os quais são responsáveis pela transição da forma de levedura para hifa, pela arquitetura da parede celular e pela coesividade do biofilme dada pela matriz. Por fim, quando as células começam a se confluir, a rede formada começa a ser constituída de uma transição de células diferenciadas em pseudohifas, hifas e leveduras, tudo envolvido pela MEP promovendo um crescimento tridimensional (MUKHERJEE *et al.*, 2005; SENEVETNANTE *et al.*, 2008). Os canais de água entre as hifas facilitam a difusão de

nutrientes do ambiente para as camadas mais profundas, permitindo também a eliminação dos resíduos resultantes da atividade celular (RAMAGE *et al.*, 2004).

Os principais fatores que podem interferir na formação do biofilme de *Candida* são: substrato, nutrientes, saliva, disponibilidade de oxigênio, MEP e as espécies de *Candida* envolvidas. As propriedades físico-químicas do substrato podem influenciar na adesão da levedura e na subsequente formação do biofilme. Assim, a topografia superficial do substrato, bem como as suas propriedades, são importantes fatores, sendo as superfícies menos rugosas e porosas as que minimizam mais a formação de biofilme. As espécies de *Candida* diferem em sua capacidade de formar biofilmes. Em geral, os biofilmes de diferentes espécies variam na sua morfologia, composição da MEP e resistência antifúngica. Alguns autores afirmam que biofilmes de *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. krusei* são mais confluentes do que os de outras espécies de *Candida* (SENEVIRATNE *et al.*, 2008).

O amadurecimento do biofilme proporciona uma arquitetura característica que possibilita uma propriedade fenotípica distinta da sua forma planctônica, principalmente no que se refere à resistência a antimicrobianos (SILVA *et al.*, 2010). Este fato é bastante preocupante, no entanto, estudos têm mostrado que novos agentes antifúngicos, como equinocandinas e formulações lipossomais de anfotericina B podem ser eficazes contra *Candida* em biofilmes (BACHMANN *et al.*, 2002; KUHN *et al.*, 2002). Diversos fatores estão relacionados com o aumento da resistência dos biofilmes de *Candida* a antifúngicos, entre os quais a alteração da taxa de crescimento e metabolismo das leveduras do biofilme (heterogenia de espécies de leveduras e mesmo de outros microorganismos), a presença de matriz extracelular (MEP, as enzimas do MEP e a barreira física formada), a expressão de genes de resistência (como bombas de efluxo de drogas, membranas com esterol e mesmo alteração na regulação de determinados genes) e a presença de células “persistir” (variações fenotípicas das leveduras selvagens, com capacidade de sobrevivência em concentrações muito superiores à CIM) (SENEVIRATNE *et al.*, 2008; UPPULURI *et al.*, 2009).

I.6. Agentes antifúngicos

Os agentes antifúngicos usados no tratamento de micoses invasivas são classificados de acordo com o tipo de ação que exercem sobre as células dos fungos. Nas classes mais comumente utilizadas, encontram-se os polienos (ex. anfotericina B, nistatina); azóis (ex. miconazol, cetoconazol, fluconazol e itraconazol) e equinocandinas (anidulafungina, caspofungina e micafungina) (ANDRIOLE *et al.*, 1999).

I.6.1. Mecanismos de resistência aos antifúngicos

O conceito microbiológico de resistência engloba a resistência primária (ou intrínseca), que é aquela presente em um organismo sem prévia exposição aos fármacos antifúngicos e a resistência secundária (ou adquirida), que é aquela desenvolvida como resposta à exposição a essas substâncias (KANAFANI e PERFECT, 2008). Normalmente, a resistência secundária é decorrente de alterações fenotípicas e/ou genotípicas de caráter estável ou transitório (BARKER e ROGERS, 2006; KONTOYIANNIS e LEWIS, 2002). Por sua vez, a resistência clínica tem sido definida como a progressão ou a persistência de uma infecção, apesar de apropriada terapia antimicrobiana (PEREA e PATTERSON, 2002). A ocorrência de resistência clínica está associada a fatores do hospedeiro, fatores farmacológicos, fatores iatrogênicos e fatores fúngicos (ESPINEL-INGROFF, 2000).

Os padrões de resistência de isolados de *Candida* derivados de urina são semelhantes aos dos isolados vaginais. A susceptibilidade antifúngica em pacientes com candidúria depende em grande parte da cepa infectante. Muitos laboratórios realizam testes padrão somente em estirpes de *Candida*-não *albicans* ou apenas quando solicitado (ACHKAR e FRIES, 2010).

Resistência aos Azóis

A utilização profilática dos azóis, principalmente o fluconazol, no tratamento e na prevenção de infecções por espécies de *Candida* aumentou a ocorrência de resistência a esta classe de antifúngicos. Diferentes mecanismos moleculares de resistência aos azóis são possíveis, dentre eles estão: mutação ou super expressão do gene (*erg11*) que codifica a enzima 14- α -desmetilase e a super expressão dos genes

cdr1, *cdr2* e *benr*, que codificam bombas de efluxo de drogas (ESPINEL-INGROFF, 2008; LOEFFLER & STEVENS, 2003).

O aumento da atividade de bombas de eliminação que regulam o transporte e/ou o acúmulo intracelular de derivados azólicos faz com que ocorra a diminuição da concentração da droga no local de ação. Estas bombas de efluxo são codificadas por duas famílias de genes: o gene *cdr* que codifica o transportador ABC (*ATP-binding Cassette*) e o gene *mdr* que codifica o transportador MSF (*Major Facilitators*), sendo estas as duas principais bombas de efluxo encontradas nestes fungos. A super-regulação de *cdr1*, *cdr2*, e *mdr1* foi demonstrada em *C. albicans* resistente aos azóis. Outros genes transportadores têm sido detectados em outras espécies de *Candida*, tais como *cgcdr1* e *pdh1* em *C. glabrata* e *cdcdr1* e *cdmdr1* em *Candida dubliniensis* (SANGLARD, 2002). Enquanto a regulação do gene *cdr* confere resistência a quase todos os azóis, as bombas de efluxo codificadas pelo gene *mdr* possuem maior especificidade para o fluconazol (KANAFANI e PERFECT, 2008). Outro mecanismo diretamente relacionado com a resistência aos azóis ocorre devido às mutações no gene *erg11*, que codifica a enzima 14- α -desmetilase, que é o sítio celular dos derivados azólicos e a enzima chave na síntese do ergosterol. Essa enzima é produto do gene *cyp51/erg11* e estas mutações levam à alteração estrutural da enzima, dificultando a ligação dos azóis ao alvo enzimático (KANAFANI e PERFECT, 2008; SANGLARD, 2002). Além disso, resistência intrínseca ao fluconazol em isolados de *C. krusei* tem sido atribuída à diminuição da afinidade de *erg11p* à droga (KANAFANI e PERFECT, 2008). O aumento da expressão do gene *erg11* parece também contribuir para a resistência aos derivados azólicos (KLEPSEK, 2001). Algumas estirpes de *Candida* com reduzida susceptibilidade aos azóis possuem maiores concentrações intracelulares de *erg11p*. Isso ocorre porque a superexpressão do gene leva a produção excessiva da enzima alvo, criando a necessidade de maiores concentrações do fármaco dentro da célula (ESPINELL-INGROFF, 2008; KANAFANI e PERFECT, 2008).

A alteração na via biossintética do ergosterol é outro mecanismo associado à resistência aos azóis. A enzima C-5,6-esterol desaturase, codificada pelo gene *erg3*, cataliza a conversão de 14- α metilfecosterol em 14- α metil-ergosta-8,24(28)-dien-3 β ,6 α -diol. Esse esterol metilado tóxico é formado com o bloqueio de *erg11p*, sendo consequência da atividade dos fármacos azóis sobre a célula fúngica. A mutação do gene *erg3* suprime o efeito tóxico e é considerado um mecanismo de resistência (MISHRA *et al.*, 2007; WHITE *et al.*, 1998). Devido a não produção de ergosterol, esse

mecanismo também está associado à resistência aos derivados poliênicos (MELLADO *et al.*, 2002; KANAFANI e PERFECT, 2008). Com a alteração da composição dos esteróis da membrana citoplasmática, o influxo celular dos azóis é afetado pela perda de fluidez e assimetria dessa organela. Este mecanismo tem sido demonstrado em isolados de *C. albicans* resistentes ao miconazol e fluconazol e *C. krusei* resistentes ao itraconazol (LOEFFLER & STEVENS, 2003).

Resistência aos Polienos

A resistência aos poliênicos está primariamente relacionada a alterações qualitativas e quantitativas dos lipídios da membrana celular fúngica (CANUTO e RODERO, 2002). Os mecanismos bioquímicos de resistência podem ser o resultado de mutações nos genes que codificam algumas das enzimas envolvidas na síntese de ergosterol. Defeitos no gene *erg3*, envolvido na biossíntese de ergosterol, podem levar a uma acumulação de outros esteróis na membrana fúngica, ao invés de ergosterol. A diminuição do conteúdo de ergosterol sem concomitante mudança em sua composição, a substituição dos esteróis com maior afinidade pelos poliênicos e a reorientação dos esteróis existentes, tornam a ligação com os poliênicos menos favorável termodinâmica e estericamente (BAKER e ROGERS, 2006; GHANNOUM e RICE, 1999). Outras fontes de resistência são o aumento da atividade da enzima catalase na célula, diminuindo a susceptibilidade ao dano oxidativo produzido pelos fármacos poliênicos e a diminuição do conteúdo de β -1,3-glucana que estabiliza a parede celular fúngica, influenciando o acesso de macromoléculas como a anfotericina B à membrana plasmática (LOEFFLER e STEVENS, 2003; SANGLARD, 2002).

Resistência às Equinocandinas

Isolados de *Candida* resistentes às equinocandinas são bastante raros. O mecanismo de resistência deste micro-organismo a estes agentes antifúngicos pode ser decorrente de um aumento na síntese da proteína *Sbep* do complexo de Golgi, controlada pelo gene *gal1*, que regula os mecanismos de transporte de componentes celulares para a parede da célula fúngica. Mutações do gene *fks1*, que codifica β -1,3-D-glucana sintetase e faz parte do complexo enzimático responsável pela síntese das β -(1,3) glucanas, também têm sido sugeridas como mecanismo de resistência às equinocandinas (PERLIN, 2007). Este mecanismo de resistência tem sido demonstrado em *C. albicans* e espécies de *Candida* – não *albicans* (*C. glabrata*, *C. krusei*, *C.*

tropicalis, *C. dubliniensis*). Em *C. glabrata*, a resistência à equinocandina também tem sido associada com mutações no gene *fkp2* (PERLIN, 2007) e dados preliminares de estudos *in vitro* sugerem CIMs desse fármaco maiores para isolados de *C. parapsilosis* do que para outras espécies de *Candida* (PFALLER, *et al.* 2002).

I.6.Objetivos

Considerando o sério impacto da tricomonose e da candidúria na saúde pública, a complexidade dos mecanismos envolvidos na interação parasito-hospedeiro e a necessidade de estudos que contribuam para o conhecimento do perfil dos isolados de *T. vaginalis* e *Candida* spp. em nossa região, os objetivos gerais deste estudo foram:

- Avaliar o perfil de suscetibilidade a fármacos de isolados de *T. vaginalis* e *Candida* spp. a partir de amostras de urina;
- Investigar se existe correlação entre fatores de virulência de *T. vaginalis* e *Candida* spp. e a suscetibilidade a fármacos, contribuindo para o conhecimento do perfil dos isolados da região sul do Brasil.

Objetivos específicos:

- Obter isolados de *T. vaginalis* e *Candida* spp. a partir de amostras de urina de usuários do Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFRGS;
- Determinar a suscetibilidade *in vitro* dos isolados de *T. vaginalis* ao metronidazol e a expressão da enzima hidrogenossomal piruvato ferredoxina oxidorreductase (PFOR);
- Investigar o envolvimento da relação simbiótica entre *M. hominis* e TVVs na virulência de isolados de *T. vaginalis*;
- Determinar a suscetibilidade *in vitro* a diferentes classes de antifúngicos de isolados de *Candida* spp. obtidos de amostras de urina;
- Avaliar a capacidade de formação de biofilme de isolados de *Candida* spp. em placa de poliestireno e sonda urinária;
- Comparar o perfil de suscetibilidade de células planctônicas, células em biofilme e células pós-formação de biofilme de *Candida* spp.

II.1. CAPÍTULO 1. Débora da Luz Becker, Odelta Santos, Amanda Piccoli Frasson, Graziela de Vargas Rigo, Geraldo Attilio De Carli, Alexandre José Macedo, Tiana Tasca. Lack of correlation of metronidazole resistance and *Mycoplasma hominis* and TVV presence in a collection of *Trichomonas vaginalis* isolates.

Manuscrito a ser submetido ao periódico Journal of Clinical Microbiology

II.2. CAPÍTULO 2 - Débora L. Becker, Paula Lüttjohann Rodrigues, Alexandre M. Fuentefria. Biofilm Formation and Antifungal Susceptibility from *Candida* Urine Isolated from Ambulatory Patients.

Manuscrito submetido ao periódico Mycopathologia.

III. Discussão Geral

A tricomonose, infecção causada pelo parasito *T. vaginalis*, é a DST não vira l mais comum no mundo, afetando cerca de 276,4 milhões de pessoas a cada ano conforme dados da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2012). Em mulheres, a infecção por *T. vaginalis* apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, variando desde apresentação assintomática até um estado de severa vaginite (MILLER e NYIRJESY, 2011). Diferente das mulheres, homens infectados apresentam, na maioria dos casos, uma infecção auto-limitada (CUDMORE *et al.*, 2004). Diversas complicações de saúde estão associadas à tricomonose, incluindo doença inflamatória pélvica, aumento do risco de infertilidade, predisposição ao câncer cervical, dificuldades na gestação, baixo peso de recém-nascidos e, com grande importância, associação à transmissão do vírus HIV (LEHKER e ALDERETE, 2000; JOHNSTON e MABEY, 2008; QUINLIVAN *et al.*, 2012). O arsenal terapêutico para o tratamento da infecção por *T. vaginalis* é bastante limitado, contando com apenas dois fármacos aprovados pelo FDA, o metronidazol e o tinidazol, ambos membros da classe dos 5-nitroimidazóis. Embora o metronidazol seja o fármaco de primeira escolha na terapêutica, diversos efeitos adversos estão relacionados ao uso do medicamento e, ao longo dos anos, relatos de falhas no tratamento da infecção por *T. vaginalis* e de isolados resistentes ao metronidazol têm sido descritos (MILLER e NYIRJESY, 2011; SCHWEBKE e BARRIENTES, 2006). A prevalência de isolados resistentes parece variar amplamente, estando compreendida entre 2,2% e 9,6% (PÉREZ *et al.*, 2001; SCHWEBKE e BARRIENTES, 2006). Considerando que 276,4 milhões de novos casos ocorrem anualmente no mundo, esse dado de prevalência de isolados resistentes torna-se preocupante. Além disso, não existem outras fontes terapêuticas disponíveis para a tricomonose. Neste cenário, é evidente a necessidade de alternativas para o tratamento desta DST. Assim, uma estratégia é a investigação por novos compostos anti-*T. vaginalis* estruturalmente distintos dos 5-nitroimidazóis e, conseqüentemente, citotóxicos por mecanismos de ação diferenciados, como demonstrado por alguns estudos do nosso grupo de pesquisa (GIORDANI *et al.*, 2010b; 2011). Paralelamente, a busca por novos alvos terapêuticos se mostra promissora, sendo uma forma racional de desenvolvimento de novos agentes antiparasitários. Neste contexto, fica clara a necessidade de estudos de caracterização dos mecanismos de virulência envolvidos na patogenicidade e capacidade de resistência deste parasito. O conhecimento acerca destes fatores fenotípicos representam um passo importante na tentativa de encontrar um novo e eficiente alvo terapêutico, além de contribuir significativamente para o conhecimento

do perfil dos isolados em nossa região, influenciando a profilaxia e a conduta terapêutica da tricomonose.

Os mecanismos envolvidos na resistência de *T. vaginalis* ao fármaco de escolha para o tratamento da tricomonose ainda não estão claramente entendidos. Ao longo dos anos, falhas no tratamento da infecção por *T. vaginalis* e surgimento de isolados resistentes ao metronidazol têm ocorrido e as evidências sugerem que a resistência pode estar aumentando (MILLER e NYIRJESY, 2011; SCHWEBKE e BARRIENTES, 2006). Embora este fármaco seja utilizado desde 1960, e o primeiro relato de resistência tenha ocorrido apenas dois anos após sua comercialização, em nosso estudo, todos os isolados apresentaram perfil de sensibilidade ao metronidazol. Em contrapartida, diversos estudos demonstram a presença de isolados resistentes a este fármaco. Em um estudo realizado na Espanha, com 91 isolados, 2,2% apresentaram baixo nível de resistência ao metronidazol (PÉREZ *et al.*, 2001). KIRKCALDY *et al.* (2012) realizaram um estudo com 538 isolados de seis diferentes cidades dos EUA e encontraram 23 isolados com resistência baixa ao metronidazol (4,3%), além disso, as CIMs para o tinidazol foram inferiores as do metronidazol. Este achado é consistente com os resultados de estudos anteriores que mostraram que o tinidazol apresentou melhor atividade *in vitro* que o metronidazol, apoiando a conduta terapêutica de prescrição do tinidazol para pacientes com resposta ineficaz ao metronidazol (CROWELL *et al.*, 2003). Em contrapartida, maiores prevalências foram encontradas por SCHWEBKE e BARRIENTES (2006), com 9,6% dos isolados resistentes (17/178). Este estudo também demonstrou que a resistência ao metronidazol foi fracamente correlacionada com a resposta clínica ao tratamento. A maior prevalência encontrada foi em um estudo em Papua, Nova Guiné, que detectou 17,4% dos isolados como altamente resistentes ao metronidazol. No entanto, o método de amostragem utilizado pelos pesquisadores não foi descrito, o que limita a confiabilidade da capacidade deste resultado estimar a prevalência de resistência da população estudada. Apesar de nosso estudo indicar um perfil de sensibilidade ao metronidazol dos isolados de *T. vaginalis* de Porto Alegre/RS, a dependência de uma única classe de antimicrobianos aumenta a vulnerabilidade à emergência da resistência.

A tricomonose é caracterizada por significativas diferenças em sua apresentação clínica como patogenicidade, perfil de sensibilidade ao metronidazol e suscetibilidade à aquisição de outros agentes de infecção. No entanto, ainda não está clara a contribuição dos fatores do hospedeiro ou das diferenças na expressão fenotípica de isolados de *T.*

vaginalis na variabilidade clínica (MEADE *et al.*, 2009). Neste contexto, nós buscamos investigar características relacionadas ao parasito que podem estar envolvidas com a sua virulência, procurando traçar um perfil e aprofundar o conhecimento acerca dos isolados de *T. vaginalis* da nossa região.

A presença de relações simbióticas é frequentemente detectada em protozoários de vida livre, que são capazes de estabelecer esta relação com algas ou bactérias, atuando como reservatórios microbianos, protegendo os micro-organismos de estresses ambientais. No entanto, esta relação é raramente descrita em micro-organismos patogênicos e o papel dos protozoários como vetores para a transmissão de doenças vinha recebendo pouca atenção (DESSI *et al.*, 2005; RAPPELLI *et al.*, 2001). O interesse pelo assunto aumentou após a constatação de que as relações simbióticas entre protozoários e bactérias podem influenciar fortemente a patogenicidade de um ou ambos micro-organismos. A capacidade de *M. hominis* para invadir, sobreviver e se multiplicar no citoplasma de *T. vaginalis* representa um importante mecanismo de defesa destas bactérias durante a infecção humana, pois o parasito proporciona um nicho protegido para a sobrevivência da bactéria, o que pode explicar a sua capacidade de resistir a estresses ambientais, como o mecanismo de defesa do hospedeiro e as terapias farmacológicas (DESSI *et al.*, 2005).

Nosso estudo encontrou 61,8% dos isolados de *T. vaginalis* infectados com *M. hominis*. Este resultado corrobora com o estudo de XIAO *et al.* (2006) com 28 isolados chineses, o qual encontrou 50% dos parasitos infectados por esta bactéria. No entanto, a prevalência descrita na literatura varia amplamente. RAPPELLI *et al.* (2001) realizou um estudo com 40 isolados de diferentes regiões geográficas (Itália, Angola e Moçambique) e 37 (92,5%) estavam infectados com *M. hominis*. Em contrapartida, BUTLER *et al.* (2010) e HAMPL *et al.* (2001) encontraram uma prevalência mais baixa de isolados infectados, 20% e 25%, respectivamente. É importante destacar que os primers utilizados em nosso estudo para identificação da região 16S de *M. hominis* estão sendo utilizados há muito tempo em estudos prévios, porém, a elucidação do genoma de *T. vaginalis* só ocorreu em 2007 (CARLTON *et al.*, 2007), e por este motivo, decidimos avaliar a especificidade destes primers através de sequenciamento. Nosso estudo é o primeiro a analisar a presença de *M. hominis* em *T. vaginalis* por esta metodologia. A presença de *M. hominis* em associação com *T. vaginalis* tem importantes implicações clínicas e esta simbiose tem sido correlacionada com a resistência do parasito ao metronidazol.

XIAO *et al.* (2006) avaliaram 28 isolados chineses e, pela primeira vez, a infecção de *T. vaginalis* com *M. hominis* foi correlacionada com a resistência *in vitro* ao metronidazol. Dos 28 isolados estudados, oito eram resistentes ao metronidazol e destes, sete estavam infectados com *M. hominis*. O mecanismo de resistência de *T. vaginalis* aos 5-nitroimidazóis ainda é desconhecido, e, não existem atualmente medicamentos em testes clínicos para o tratamento de *T. vaginalis*. Se a infecção do parasito por *M. hominis* estivesse realmente relacionada a sua resistência, antibióticos específicos para *Mycoplasma* poderiam ser coadministrados com o 5-nitroimidazol, aumentando a eficácia do tratamento. Além disso, a detecção rápida de isolados resistentes poderia ser realizada através da detecção do DNA de *M. hominis* por técnicas de biologia molecular (BUTLER *et al.*, 2010). No entanto, nosso estudo foi incapaz de confirmar a associação da infecção por *M. hominis* e a resistência *in vitro* ao metronidazol. Todos os 34 isolados incluídos na pesquisa foram sensíveis ao metronidazol e 61,8% estavam infectados com *M. hominis*. Estes resultados apoiam os obtidos por BUTLER *et al.* (2010), com 55 isolados dos EUA, os quais também não suportaram a hipótese de que a presença de *M. hominis* é suficiente para conferir resistência clínica do isolado de *T. vaginalis* ao metronidazol, deixando evidente que não existe correlação entre a presença desta bactéria e a resistência ao fármaco. No entanto, deve-se considerar que existem diferenças entre as cepas de *M. hominis* e o número de bactérias que infectam o *T. vaginalis* (XIAO *et al.*, 2006; RAPPELLI *et al.*, 2001). Assim, é possível que isolados de *T. vaginalis* infectados com certos tipos de *M. hominis* ou que tenham mais células bacterianas por parasito apresentem maior nível de resistência (BUTLER *et al.*, 2010). Estudos adicionais são essenciais para demonstrar quais moléculas estariam envolvidas na entrada de *M. hominis* no parasito e a correlação entre a presença destas moléculas com a resistência ou suscetibilidade dos isolados de *T. vaginalis* à infecção com bactérias para determinar o papel da presença desta bactéria na patogênese da tricomonose. Além disso, a determinação de fatores genéticos que contribuem para a resistência ao metronidazol e o desenvolvimento de testes moleculares para a rápida identificação de isolados resistentes são necessários.

Diversos estudos demonstram que aproximadamente metade de todos os isolados de *T. vaginalis* é infectada com vírus de dsRNA (do inglês *double strand RNA*) ou VLPs (do inglês *virus-like particles*) (GERHOLD *et al.*, 2009; FRAGA *et al.*, 2005). Porém, é observada uma grande variabilidade na prevalência desta infecção em *T. vaginalis*. Nosso estudo encontrou 88,2% dos isolatos infectados por diferentes espécies

de TVVs, corroborando com a alta prevalência observada no estudo de WEBER *et al.* (2003), que encontrou estas partículas de dsRNA em 82% dos 72 isolados de *T. vaginalis* da África do Sul. Taxa elevada de infecção também foi observada por WENDEL *et al.* (2002), em um estudo realizado com 28 isolados de Baltimore (EUA), 75% estavam infectados por estas partículas. Em estudos realizados com isolados de Cuba e EUA as taxas foram próximas a 50 e 55%, respectivamente (FRAGA *et al.*, 2005; SNIPES *et al.*, 2000). Já um estudo realizado na Coreia encontrou apenas 13,6% dos isolados infectados com TVVs (KIM *et al.*, 2007), demonstrando que a taxa de infecção pode variar de acordo com a localização geográfica. Quanto à prevalência das espécies de TVVs nos isolados estudados, nós encontramos TVV1 como sendo a mais prevalente, seguida do TVV3, TVV2 e TVV4. GOODMAN *et al.* (2011) utilizaram cinco isolados em seu estudo e também encontraram TVV1 como sendo a espécie mais prevalente, já FRAGA *et al.* (2012), realizaram um estudo com 21 isolados infectados por TVV, encontrando maior prevalência de TVV2 (12) em relação ao TVV1 (6), e três isolados estavam co-infectados com as duas espécies. A prevalência de co-infecção em nosso estudo foi mais elevada, 9 dos 30 isolados apresentaram mais de uma espécie de TVV (30%), no entanto, o estudo de FRAGA *et al.* (2012) pesquisou apenas as espécies de TVV1 e 2. Infelizmente, poucos estudos determinam a presença de TVVs a nível de espécie, não sendo possível uma comparação com outros resultados.

Enquanto alguns estudos sugeriram que a infecção de *T. vaginalis* com TVV pode resultar em citopatogenicidade atenuada e resposta inflamatória aguda (KIM *et al.*, 2007), outros sugerem que a presença de TVV pode aumentar a virulência do isolado de *T. vaginalis*, através da regulação da expressão de uma proteína imunogênica, a P270, variações fenotípicas nos protozoários e regulação de determinadas proteínas, como cisteína proteases (GOODMAN *et al.*, 2011a; PROVENZANO *et al.*, 1997). Sendo assim, a infecção de isolados de *T. vaginalis* por TVVs poderia muito possivelmente modular a patogenicidade do parasito. Além disso, diferenças na sintomatologia, resistência aos fármacos e transmissibilidade também poderiam estar envolvidos (GOODMAN *et al.*, 2011a; GOODMAN *et al.*, 2011b). Um estudo realizado com adolescentes do sexo feminino em Havana, Cuba, demonstrou significativa relação entre a presença de dsRNA em *T. vaginalis* e sinais e sintomas da tricomonose. Todos os isolados obtidos de pacientes sintomáticos foram positivos para a presença de TVV. A presença de corrimento vaginal, disúria, dispareunia, e eritema cervical, mas não prurido, eritema vulvar ou vaginal, foram significativamente associados com a infecção

do isolado por TVV (FRAGA *et al.*, 2007). Estudos realizados por KHOSHMAN e ALDERETE (1994) sugeriram que a presença de TVV pode mediar a resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro humano, através da regulação da expressão de fatores de virulência do protozoário. Um estudo recente demonstrou que a endossimbiose entre *T. vaginalis* e dsRNA virais representam um importante alvo para modificar a reação inflamatória causada pela infecção parasitária no hospedeiro humano. Os resultados obtidos por FICHOROVA *et al.* (2012) sugerem que a presença do TVV pode estar envolvida na super-regulação de TLR3, sinalização e inflamação do trato reprodutivo. Enfim, mais estudos são necessários a fim de correlacionar a presença de TVVs em isolados de *T. vaginalis* com a patogenicidade e sintomatologia da tricomonose. Apesar do papel dos vírus dsRNA não estar elucidado, a associação de regulação de proteínas e mudança fenotípica com a infecção pelo vírus sugere que a presença intracelular de TVVs pode estar associada com a virulência deste protozoário (GERHOLD *et al.*, 2009). Embora o papel dos TVVs na virulência de *T. vaginalis* ainda permaneça desconhecido, é importante ressaltar a possibilidade deste protozoário estar atuando como um vetor de agentes infecciosos (BENCHIMOL *et al.*, 2002). Além disso, vale destacar também, que a capacidade de *T. vaginalis* internalizar e carrear partículas de HIV-1 por curto período de tempo e ingerir e digerir linfócitos infectados com HIV-1 em condições *in vitro* já foi demonstrada (RENDÓN-MALDONADO *et al.*, 2003).

A ocorrência de VLPs e dsRNA em isolados de *T. vaginalis* (WANG e WANG 1986), a presença de relação simbiótica com *M. hominis* (XIAO *et al.*, 2006) e um relatório indicando a aquisição de vírus humanos conhecidos por *T. vaginalis* (PINDAK *et al.* 1989) sugerem que o parasito pode servir como um veículo para outros microorganismos, desempenhando o papel de um transportador de agentes infecciosos. Já foi demonstrado que os protozoários podem servir como “cavalos de Tróia” de patógenos bacterianos (BAKER e BROWN, 1994), como por exemplo, as amebas de vida livre, *Acanthamoeba* spp., que servem como hospedeiros naturais para bactérias do gênero *Legionella* (CIRILLO *et al.*, 1994), e este papel parece estar sendo desempenhado pelo *T. vaginalis*.

Em resumo, a abordagem desta dissertação permitiu a avaliação de importantes características relacionadas ao perfil de isolados de *T. vaginalis* no sul do Brasil. Nossos resultados demonstram alta prevalência de *T. vaginalis* infectados com *M. hominis* e diferentes espécies de TVVs, além disso, foi observado um perfil de sensibilidade ao metronidazol. A partir dos resultados obtidos, podemos inferir que a relação simbiótica

entre o protozoário e os micro-organismos pesquisados não está correlacionada com sua resistência a fármacos. Embora o papel destes micro-organismos na patogenicidade de *T. vaginalis* ainda permaneça desconhecido, é importante ressaltar a possibilidade deste protozoário estar atuando como um vetor de agentes infecciosos. Além disso, nosso estudo contribui significativamente para o conhecimento do perfil de isolados de *T. vaginalis* do Rio Grande do Sul, contribuindo desta forma na conduta terapêutica da tricomonose.

Resultados relevantes considerando a suscetibilidade dos isolados de *Candida* spp. a fármacos e formação de biofilme foram obtidos durante o desenvolvimento desta dissertação. O perfil de suscetibilidade *in vitro* de 25 isolados de leveduras obtidas de amostras de urina para os fármacos fluconazol, cetoconazol, miconazol, nistatina e anidulafungina foi determinado através da técnica de microdiluição em caldo do CLSI. De um modo geral, todos os antifúngicos testados exibiram uma boa atividade *in vitro* contra a maioria dos isolados, sendo a nistatina o antifúngico mais eficaz, visto que todas as cepas foram sensíveis.

Segundo alguns autores, o uso excessivo de fluconazol na terapêutica poderia estar associado com o aumento das CIMs exibidas por diferentes espécies de leveduras, pois isso estaria selecionando o aparecimento de resistência em isolados previamente sensíveis (KANAFANI e PERFECT, 2008; TOBUDIC *et al.*, 2012). No entanto, a análise do perfil de suscetibilidade dos isolados clínicos de *Candida* demonstrou CIMs relativamente baixas, o que está de acordo com outros estudos brasileiros em que foram verificadas baixas taxas de resistência aos antifúngicos quando utilizado o ensaio de microdiluição em caldo (DA MATTA *et al.*, 2007; DEMITTO *et al.*, 2012).

Embora a *C. albicans* seja a espécie mais comumente isolada nos casos de candidúria, a detecção de isolados de *Candida* não-*albicans*, muitas vezes consideradas espécies emergentes, vem se tornando cada vez mais frequente, o que requer uma atenção especial na precisão da metodologia de identificação. Em nosso estudo 52% das espécies isoladas foram identificadas como *C. albicans*, 36% como *C. tropicalis*, 8% como *C. krusei* e 4% como *C. parapsilosis*. Estes resultados estão de acordo com outros estudos brasileiros que demonstram que as espécies mais prevalentes isoladas na urina são *C. albicans* e *C. tropicalis*. Benelli *et al.* (2006) encontraram prevalência de 52,2% de *C. albicans* e 43,5% de *C. tropicalis* em seu estudo. No estudo de Kauffman *et al.* (2000), onde um total de 861 episódios de candidúria em pacientes hospitalizados foram avaliados, *Candida albicans* respondeu por 52% dos isolados, seguido por

Candida glabrata e *Candida tropicalis*. Em nosso estudo, nenhuma cepa de *C. glabrata* foi identificada, apesar de esta espécie ser a terceira mais frequente em isolados de urina. Este fato pode ser explicado pela população incluída em nosso estudo, pois esta espécie é frequente em pacientes hospitalizados, principalmente idosos e imunocomprometidos (ABI-SAID *et al.*, 1997). *C. parapsilosis* e *C. krusei* são menos frequentes nos isolados de candidúria, o que também está de acordo com nossos resultados. *C. parapsilosis* é um importante patógeno hospitalar, possuindo alta capacidade de produzir biofilme (LEVINE *et al.*, 1998). *C. krusei* já foi considerada como um patógeno hospitalar ocasional, no entanto, sua frequência vem aumentando, sendo um fato preocupante uma vez que esta espécie apresenta resistência intrínseca ao fluconazol (REX *et al.*, 1995; ZARDO *et al.*, 2004).

Em relação à capacidade de formação de biofilme em microplaca, nossos resultados corroboram com os estudos de Pierce *et al.* (2008) e Thein *et al.* (2007), nos quais diversas espécies de fungos também apresentaram alta capacidade de formação de biofilme em superfícies de poliestireno quando avaliadas sob diferentes condições ambientais. Dentre as espécies com forte capacidade de adesão destaca-se *C. tropicalis* com 75%, seguida de *C. albicans* e *C. parapsilosis*, ambas com 12,5%. Estes dados são compatíveis aos observados por Minagi *et al.* (1985), em que a *C. tropicalis* demonstrou maior aderência a polímeros plásticos do que a *C. albicans*, e com os resultados encontrados por Pannanusorn *et al.* (2012), que demonstraram uma alta frequência de isolados clínicos de *C. tropicalis* (87%) fortes produtores de biofilme. Neste trabalho, 77,8% dos isolados de *C. tropicalis* apresentaram capacidade de formar biofilme, sendo 66,6% fortes formadores. Shin *et al.* (2002) descreveram uma alta frequência de formação de biofilme entre os isolados clínicos de *Candida* não-*albicans* em comparação aos isolados de *C. albicans* (61% e 8%, respectivamente), sendo que as principais espécies formadoras de biofilme neste estudo foram *C. tropicalis* (80%) e *C. parapsilosis* (73%), corroborando com os resultados encontrados em nosso estudo.

Entretanto o impacto da formação de biofilme como um importante fator de virulência de diferentes espécies de *Candida* ainda não está totalmente compreendido. Vários estudos têm demonstrado que os biofilmes fúngicos apresentam um aumento dos níveis de resistência frente aos antifúngicos, principalmente azólicos e poliênicos, dificultando assim o tratamento das infecções causadas por estes agentes (RAMAGE *et al.*, 2012). Neste sentido, procurou-se correlacionar neste trabalho a produção de

biofilme em poliestireno e sonda urinária com a suscetibilidade a diferentes antifúngicos de células planctônicas, células em biofilme e células pós-formação de biofilme.

A produção de biofilme também pode ser associada ao desenvolvimento e persistência de infecções fúngicas importantes, principalmente aquelas relacionadas ao uso de dispositivos implantáveis, como as fungemias, já que as células presentes no biofilme são resistentes aos antimicrobianos, como extensivamente demonstrado na literatura (DOUGLAS, 2003; Lafleur *et al.*, 2006; SEIDLER *et al.*, 2008; RAMAGE *et al.*, 2009; RAMAGE *et al.*, 2012).

A maioria dos métodos utilizados na determinação de suscetibilidade de leveduras a antifúngicos têm sido aplicados em células cultivadas em suspensão, contudo, na maioria das vezes as leveduras encontram-se no seu habitat natural sob a forma de comunidades microbianas sésseis, formando biofilmes. O aumento de fenótipos de organismos sésseis resistentes a agentes antimicrobianos levou à necessidade de se desenvolver métodos normalizados para o estudo da suscetibilidade de biofilmes (COSTERTON *et al.*, 1999; GANDER, 2004; GILBERT *et al.*, 2004; , HOYLE e COSTERTON, 2004; STICKLER, 2004). Além disso, a capacidade de formação de biofilme também está relacionada com o tipo de superfície utilizada para a adesão inicial. Neste sentido, vários trabalhos têm mostrado que os micro-organismos aderem-se mais facilmente em superfícies hidrofóbicas e apolares, tais como o poliestireno e outros materiais plásticos (RAMAGE *et al.*, 2009).

Em nosso estudo, 84% das cepas testadas formaram biofilme em placa de poliestireno e, das 8 cepas selecionadas para os ensaios de formação de biofilme em corpo de prova, todas foram capazes de formar biofilme em sonda urinária. Além disso, a avaliação do perfil de suscetibilidade a antifúngicos em células de biofilme mostrou um aumento significativo das CIM, demonstrando que a estrutura de biofilme formada por estas células é um importante fator de virulência. Os testes de suscetibilidade com células planctônicas pós-formação de biofilme demonstraram um aumento significativo da CIM para duas cepas (*C. tropicalis* e *C. parapsilosis*) contra o antifúngico fluconazol.

Fatores como a expressão de genes de resistência ou limitações difusionais impostas pela matriz polimérica poderiam explicar a maior resistência dos biofilmes. Alguns autores consideram que as limitações difusionais à penetração do antifúngico através do biofilme podem ser consideradas um mecanismo de resistência (DONLAN e COSTERTON, 2002; MAH e O'TOOLE, 2004). A passagem do antifúngico através das

diferentes camadas de células e da matriz polimérica faz com que a concentração que atinge as células mais internas do biofilme seja inferior. Os biofilmes microbianos são notoriamente mais resistentes do que as células em suspensão a uma grande variedade de agentes antimicrobianos, incluindo antibióticos, antissépticos e biocidas industriais. Exemplos disso são os biofilmes formados por bactérias (já muito estudados) que são 10 a 1000 vezes mais resistentes a antibióticos do que as células planctônicas (DONLAN e COSTERTON, 2002). O aumento da resistência antifúngica de biofilmes de *Candida* foi demonstrado pela primeira vez em 1995 em um estudo utilizando discos de material polimérico, utilizado na fabricação de cateteres. Os pesquisadores demonstraram que os biofilmes de *Candida* são 30 à 200 vezes mais resistentes que as células planctônicas a vários antifúngicos, como anfotericina B, fluconazol, itraconazol e cetoconazol (HAWSER e DOUGLAS, 1995). Pesquisas posteriores confirmaram estas observações em diferentes superfícies, como superfícies celulósicas (BAILLIE e DOUGLAS, 1998, 2003), poliestireno (RAMAGE *et al.*, 2001ab), silicone (CHANDRA *et al.*, 2001) e acrílico dentário (CHANDRA *et al.*, 2003).

Vários fatores têm sido associados ao aumento da resistência antifúngica de biofilmes de *Candida*. Dentre eles estão a alteração da taxa de crescimento/metabolismo das células do biofilme, a presença de matriz extracelular, a expressão de genes de resistência e a presença de células “*persisters*” (SENEVERIATNE, 2008). Em geral, o MEP pode atuar como uma barreira física que impede o acesso de agentes antimicrobianos nas células incorporadas na comunidade de biofilme, contribuindo assim, para a sua resistência (SENEVERIATNE, 2008). Mecanismos moleculares também estão sendo sugeridos como importantes fatores na resistência antifúngica, no entanto este mecanismo não está bem elucidado. Estudos têm demonstrado o envolvimento de genes codificadores de bombas de efluxo de drogas, mecanismo já conhecido na resistência a antifúngicos azólicos (MUKHERJEE *et al.*, 2003). No entanto, tem sido demonstrado que a expressão dos genes *mdr* e *cdr* em biofilmes é fase específica, contribuindo para a resistência aos azólicos somente durante a fase inicial, mas não na fase de crescimento do biofilme, enquanto mudanças na composição do esterol, componente da parede celular fúngica, estão envolvidas na resistência aos azólicos na fase madura do biofilme (GARCIA-SANCHEZ *et al.*, 2004). Estudos genômicos de biofilmes de *Candida* têm proporcionado importantes percepções sobre os mecanismos que regem a formação de biofilme. Um dos interessantes resultados destes estudos genômicos é a geração de evidência substancial do papel fundamental da

formação de hifas em biofilmes de *Candida* (RAMAGE *et al.*, 2002; GARCIA-SANCHEZ *et al.*, 2004; NOBILE e MITCHELL *et al.*, 2006). A maioria dos genes identificados, que são críticos para a formação do biofilme, são, pelo menos indiretamente, ligados a genes que regulam o desenvolvimento de hifas (NOBILE e MITCHELL, 2006). No entanto, mais estudos são necessários a fim de ajudar na compreensão dos mecanismos envolvidos na formação do biofilme de *Candida*.

Candida albicans é a espécie mais conhecida do gênero e considerada de maior interesse clínico por ainda corresponder ao principal agente de infecções fúngicas em humanos. Porém, as espécies de *Candida* não-*albicans* são emergentes em várias partes do mundo e o aumento desses agentes em infecções pode estar associado a maior expressão dos fatores de virulência (ST-GERMAIN *et al.*, 2001). *Candida* não-*albicans* apresentaram aderência e propriedades hidrofóbicas significativamente superiores a *C. albicans* e as interações hidrofóbicas estão envolvidas no processo de aderência de *Candida* às superfícies das células do hospedeiro (DOYLE e ROSENBERG, 1990).

Os biofilmes de *Candida* podem se formar rapidamente em superfícies de plástico, tais como cateteres de Foley e dispositivos intra-uterinos (DIU). A formação do biofilme pode diferir amplamente entre as cepas de *Candida* e isolados urinários podem ser diferenciados em fenótipos de baixa ou alta aderência (ACHKAR e FRIES, 2010). Cateteres urinários são dispositivos tubulares, de látex ou silicone, que são inseridos através da uretra para a bexiga. Segundo estudo realizado por Zimakoff *et al.* (1993), a porcentagem de pacientes submetidos à sondagem vesical é de 13,2% para pacientes hospitalizados, 4,9% para lares de idosos e 3,9% para pacientes que recebem cuidados em casa. O cateter de Foley tem um balão insuflável que mantém o cateter na bexiga e, uma vez instalado, é ligado a um tubo de drenagem e saco de coleta (STICKLER, 1996). Sistemas de cateteres podem ser sistemas fechados ou abertos. Em sistemas abertos, o cateter drena a urina para um sistema de coleta aberto; em sistemas fechados, a drenagem é feita para um saco coletor fechado. Em sistemas abertos, os cateteres rapidamente são contaminados, e os pacientes normalmente desenvolvem infecções do trato urinário dentro de 4 dias (KAYE e HESSEN, 1994). Os pacientes com sistemas fechados são muito menos suscetíveis a infecções do trato urinário e a urina do paciente pode permanecer estéril de 10 a 14 dias, em aproximadamente metade dos pacientes (KAYE e HESSEN, 1994). Stickler *et al.* (1993) demonstraram que independente do tipo do sistema (aberto ou fechado), 10 a 50% dos pacientes submetidos a cateterização a curto prazo (até 7 dias) desenvolveram infecções, ao passo

que todos os pacientes submetidos a cateterização a longo prazo (superior a 28 dias) desenvolveram infecções do trato urinário. Já Mclean *et al.* (1995) observaram que o risco de infecção associada a cateter aumenta 10% para cada dia de uso deste dispositivo. Nossos resultados demonstraram que todas as leveduras testadas no ensaio de corpo de prova, com sonda urinária, foram capazes de formar biofilme em um período de 96h. Os dados observados condizem com os da literatura, confirmando a grande capacidade de formação de biofilme deste gênero (ACHKAR e FRIES, 2010; STICKLER *et al.* 1993).

A busca por alternativas para combater a resistência de biofilmes de *Candida* estão focadas em novos agentes antifúngicos, apresentações lipossomais e o sinergismo entre antifúngicos. A classe das equinocandinas e formulações lipossomais de anfotericina B podem ser eficazes contra estas células em biofilmes (BACHMANN *et al.*, 2002; KUHN *et al.*, 2002). Além disso, o efeito de sinergismo de anfotericina B e posoconazol já foi relatado como eficiente contra biofilmes de *C. albicans*. A hipótese sugerida pelos autores é que o posoconazol administrado em combinação com a anfotericina B sofra alguma mudança estrutural que afeta a matriz do biofilme e as células fúngicas que estão dentro do biofilme (TOBUDIC *et al.*, 2010). Combinações de agentes antifúngicos contra biofilmes podem melhorar a eficácia, reduzir as doses de droga e minimizar o desenvolvimento de resistência aos fármacos. Esta pode ser uma estratégia importante para a erradicação de biofilmes associados a infecções (VENKATESH *et al.*, 2009).

Em conclusão, nossos resultados reforçam a alta capacidade de formação de biofilme do gênero *Candida* e a necessidade de se buscar nossas alternativas terapêuticas para o combate destas estruturas, que se tornam resistentes à maioria dos antifúngicos disponíveis no mercado. Além disso, nossos resultados demonstram a importância da correta escolha da terapia antifúngica para o tratamento de infecções relacionadas com o biofilme e a necessidade da aplicação de ensaios de suscetibilidade específicos para biofilme, pois os testes de suscetibilidade baseados em valores de MIC por si só não podem determinar com precisão a suscetibilidade exata do biofilme fúngico. Além disso, nossos resultados contribuem significativamente para o conhecimento do perfil dos isolados de *Candida* obtidos de urina em nossa região, auxiliando na conduta terapêutica a ser tomada em pacientes com candidúria, bem como, na profilaxia de infecções fúngicas associadas a cateteres.

III.2. Conclusões Gerais

Os resultados obtidos no desenvolvimento desta dissertação permitem as seguintes conclusões:

Capítulo I

- Diferentes isolados de *T. vaginalis* da região sul do Brasil apresentaram sensibilidade ao metronidazol;
- Os isolados expressaram a enzima PFOR;
- Alta prevalência de isolados de *T. vaginalis* infectados com *M. hominis* e diferentes espécies de TVVs;
- Ausência de correlação entre a presença de *M. hominis* e TVVs com a resistência ao metronidazol.

Capítulo II:

- De um modo geral, as leveduras do gênero *Candida* apresentaram perfil de sensibilidade aos diferentes antifúngicos testados;
- Capacidade de formar biofilme em placa de poliestireno foi observada na maioria dos isolados;
- Das oito cepas selecionadas para os ensaios de formação de biofilme em corpo de prova, todas foram capazes de formar biofilme em sonda urinária;
- Os ensaios de determinação da CMEB demonstraram que a concentração de antifúngico necessária para erradicar o biofilme de células leveduriformes é significativamente maior que a CIM de células planctônicas, além disso, na maioria dos casos não foi possível determinar a CMEB, pois estava acima da maior concentração de antifúngico testada;
- Os ensaios de suscetibilidade com células pós-formação de biofilme demonstraram que, de modo geral, não houve diferença entre a CIM obtida neste ensaio e a CIM de células planctônicas, no entanto, dois isolados que eram sensíveis ao fluconazol tornaram-se resistentes.

III.3.Perspectivas

No sentido de avançar no entendimento acerca dos fatores de virulência de *T. vaginalis* e *Candida* spp. algumas perspectivas são sugeridas:

- Avaliar a expressão da enzima piruvato ferredoxina oxidoredutase (PFOR) por PCR em tempo real;
- Realizar os experimentos de determinação da CMEB com os isolados de *Candida* moderados, fracos e não produtores de biofilme, a fim de determinar se existe correlação entre a capacidade de formar biofilme, a CIM de células planctônicas, a CMEB de células em biofilme, a espécie do isolado e o antifúngico testado;
- Verificar a capacidade de formação de biofilme em sonda urinária de isolados moderados, fracos e não produtores de biofilme em placa de poliestireno.

III.4.Referências

ABI-SAID D, ANAISSIE E, UZUN O, RAAD I, PINZCOWSKI H, VARTIVARIAN S. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clinical Infectious Diseases*, v.24, n.6, p.1122-8, 1997.

ACHKAR JM, FRIES BC. *Candida* infections of the genitourinary tract. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 23, p.253-73, 2010.

ALDERETE, J. F. The *Trichomonas vaginalis* phenotypically varying P270 immunogen is highly conserved except for numbers of repeated elements. *Microbial Pathogenesis*, v.27, n.2, p.93-104, 1999.

ALDERETE, J. F.; ARROYO, R.; LEHKER, M. W. Analysis for adhesins and specific cytoadhesion of *Trichomonas vaginalis*. *Methods in Enzymology*, v.253, p.407- 414, 1995a.

ALDERETE, J. F.; MILLSAP, K. W.; LEHKER, M. W.; BENCHIMOL, M. Enzymes on microbial pathogens and *Trichomonas vaginalis*: molecular mimicry and functional diversity. *Cellular Microbiology*, v.3, p.359-370, 2001.

ALDERETE, J.F.; KASMALA, L.; METCALF, E.; GARZA, G.E. Phenotypic variation and diversity among *Trichomonas vaginalis* isolates and correlation of phenotype with trichomonal virulence determinants. *Infection and Immunity*, v.53, p.285-293, 1986.

ALI, V.; NOZAKI, T. Current Therapeutics, Their Problems, and Sulfur Containing-Amino-Acid Metabolism as a Novel Target against Infections by “Amitochondriate” Protozoan Parasites. *Clinical Microbiology Reviews*, v.20, n.1, p.164-187, 2007.

ANDRIOLE V.T. *Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 44, p. 151-162, 1999.

ARAUJO, C.R.; MIRANDA, K.C.; PASSOS, X.S.; SOUZA, L.K.H.; LEMOS, J.A.; KHRAIS, C.H.A.; COSTA, C.R.; SILVA, M.R.R.; FERNANDES, O.F.L. Identificação das leveduras do gênero *Candida* por métodos manuais convencionais e pelo método cromógeno CHROagarTM *Candida*. *Revista de Patologia Tropical*, v.34, n.1, p.37-42, 2005.

ARROYO, R.; ALDERETE, J. F. *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells. *Infection and Immunity*, v.57, p.2991–2997, 1989.

ARROYO, R.; GONZALEZ-ROBLES, A.; MARTINEZ-PALOMO, A.; ALDERETE, J. F. Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesion synthesis follows cytoadherence. *Molecular Microbiology*, v. 7, p. 299-309, 1993.

BACHMANN, S.P.; VANDEWALLE, K.; RAMAGE, G. *In vitro* activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v.46, p.3591-3596, 2002.

BAILLIE, G.S.; DOUGLAS, J. Iron-limited biofilms of *Candida albicans* and their susceptibility to Amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.42(8), p.2146-2149, 1998.

BAILLIE, G.S.; DOUGLAS, L.J. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *Journal of Medical Microbiology*, v.48, p.671-679, 2003.

BAKER, J.; BROWN, M.R.W. Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology*, v.140, p.1253-1259, 1994.

BARKER, K.S.; ROGERS, P.D. Recent Insights into the Mechanisms of Antifungal Resistance. *Current Infectious Disease Reports*, v.8, n.6, p.449-456, 2006.

BEACH, D. H.; HOLZ, G. G.; SINGH, Jr. B. N.; LINDMARK, D. G. Fatty acid and sterol metabolism of cultured *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.38, p.175-190, 1990.

BEACH, D. H.; HOLZ, G. G.; SINGH, Jr. B. N.; LINDMARK, D. G. Phospholipid metabolism of cultured *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.44, p.97-108, 1991.

BENCHIMOL, M. Hydrogenosomes under microscopy. *Tissue Cell*, v. 41, p. 151-168, 2009.

BENCHIMOL, M. Trichomonads under Microscopy. *Microscopy and Microanalysis*, v. 10, p. 528-550, 2004.

BENCHIMOL, M.; CHANG, T. H.; ALDERETE, J.F. Visualization of new virus-like-particles in *Trichomonas vaginalis*. *Tissue & Cell*, v.34, n.6, p.406-415, 2002.

BESSARAB, I. N.; LIU, H. W.; IP, C. H.; TAI, J. H. The Complete cDNA Sequence of a Type II *Trichomonas vaginalis* Virus. *Virology*, v.267, p.350-359, 2000.

BIALKOVÁ, A.; SUBIK, J. Biology of the pathogenic yeast *Candida glabrata*. *Folia Microbiologica*, v.51, p.3-20, 2006.

BINELLI, C.A.; MORETTI, M.L.; ASSIS, R.S.; SAUAIA, N.; MENEZES, P.R.; RIBEIRO, E.; GEIGER, D.C.P.; MIKAMI, Y.; MIYAJI, M.; OLIVEIRA, M.S.; BARONE, A.A.; LEVIN, A.S. Investigation of the possible association between nosocomial candiduria and candidaemia. *Clinical Microbiology and Infection*, v.12, p.538-543, 2006.

BLANKENSHIP, J.R.; MITCHELL, A.P. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Current Opinion in Microbiology*, v. 9, n.6, p. 588-94, 2006.

BRAVO, R. S.; GIRALDO, P. C.; CARVALHO, N. S.; GABIATTI, J. R. E.; VAL, I. C. C.; GIRALDO, H. P. D.; PASSOS, M. D. L. Tricomoniase Vaginal: o que se Passa? *Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis*, v.22, n.2, p.73-80, 2010.

BROWN, A.J.P. Expression of Growth Form-Specific Factors during Morphogenesis in *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.7, p.87-122, 2003.

BROWN, A.J.; ODDS, F.C.; GOW, N.A. Infection-related gene expression in *Candida albicans*. *Current Opinion in Microbiology*, v.10, p.307-313, 2007.

BUTLER, S. E.; AUGOSTINI, P.; SECOR, W. E. *Mycoplasma hominis* infection of *Trichomonas vaginalis* is not associated with metronidazole-resistant trichomoniasis in clinical isolates from the United States. *Parasitology Research*, v.107, p.1023-1027, 2010.

CAMARGO, F. P.; ALVES, I. A.; PARLOW, M. S.; GOULART, L. S. Isolamento de *Candida* sp. da Mucosa Vaginal de Mulheres Atendidas em um Serviço de Ginecologia do Município de Santo Ângelo – RS. *News Lab*, v.87, p.96-104, 2008.

CAMPBELL, C.K.; DAVEY, K.G.; HOLMES, A.D.; SZEKELY, A.; WARNOCK, D.W. Comparison of the API Candida System with the AUXACOLOR System for Identification of Common Yeast Pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37(3), p.821-823, 1999.

CANUTO, M. M.; RODERO, G. F. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. *The Lancet Infectious Diseases*, v.2, p.550-563, 2002.

CARLTON, J. M.; HIRT, R. P.; SILVA, J. C.; DELCHER, A. L.; SCHATZ, M.; ZHAO, Q.; WORTMAN, J. R.; BIDWELL, S.L. Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science*, v. 315, p. 207-212, 2007.

CARRILLO-MUÑOZ, A.J.; BRIÓ, S.; QUINDÓS, G. Una nueva generación de fármacos antifúngicos. *Rev Iberam Micol*, v.18, p.2-5, 2001.

CASSELL, G. H.; WAITES K. B.; CROUSE, D. T. Perinatal mycoplasmal infections. *Clinics in Perinatology*, v.18, p.241-262, 1991.

CASSONE, A.; BERNARDIS, F.; SANTONI, G. Anticandidal Immunity and Vaginitis: Novel Opportunities for Immune Intervention. *Infection and Immunity*, v.75, n.10, p. 4675-4686, 2007.

CHAFFIN, W.L.; LÓPEZ-RIBOT, J.L.; CASANOVA, M.; GOZALBO, D.; MARTINEZ, J.P. Cell Wall and Secreted Proteins of *Candida albicans*: Identification, Function and Expression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.62, n.1, p.130-180, 1998.

CHANDRA, J.; KUHN, D.M.; MUKHERJEE, P.K.; HOYER, L.L.; MCCORMICK, T.; GHANNOUM, M.A. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture and drug resistance. *Journal of Bacteriology*, v.183(18), p.5385-5394, 2001.

CHANDRA, J. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic *in vitro*. *Journal of Dental Research*, v.80, p.903-908, 2003.

CHERPES TL, WIESENFELD HC, MELAN MA, KANT JA, COSENTINO LA, MEYN LA, HILLIER SL. The Associations between Pelvic Inflammatory Disease, *Trichomonas vaginalis* Infection, and Positive Herpes Simplex Virus Type 2 Serology. *Sexually Transmitted Infections*, v.33, p.747-752, 2006.

CIRILLO, J. D.; CIRILLO, S. L.; YAN, L.; BERMUDEZ, L. E.; FALKOW, S.; TOMPKINS, L. S. Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity*, v.67, p.4427-4434, 1999.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. Candiduria: a clinical and therapeutic approach. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.40, n.3, p.332-7, 2007.

COOKE, V.M.; MILES, PRICE, R.G.; MIDGLEY, G.; KHAMRI, W.; RICHARDSON, A.C. New Chromogenic Agar Medium for the Identification of *Candida* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, n.7, p.3622-3627, 2002.

COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; EDGERTON, M. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, v.283, p.1318-1322. 1999.

COTCH, M. F.; PASTOREK, J. G. 2nd.; NUGENT, R. P.; YERG, D. E.; MARTIN, D. H.; ESCHENBACH, D. A. Demographic and behavioral predictors of *Trichomonas vaginalis* infection among pregnant women. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. *Obstetrics and Gynecology*, v.78, p.1087-1092, 1991.

COTCH, M. F.; PASTOREK II, J. G. N.; NUGENT, R. P.; HILLIER, S. L.; GIBBS, R. S.; MARTIN, D. H.; ESCHENBACH, D. A.; EDELMAN, R.; CAREY, J. C.; REGAN, J. A.; KROHN, M. A.; KLEBANOFF, M. A.; RAO, A. V.; RHOADS, G. G. *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. *Sexually Transmitted Diseases*, v.24, p.353-360, 1997.

CROWELL, A. L.; SANDERS, L. K. A.; EVAN, S. W. *In vitro* metronidazole and tinidazole activities against metronidazole-resistant strains of *Trichomonas vaginalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, p. 1407-1409, 2003.

CUDMORE, S. L.; DELGATY, K. L.; HAYWARD-MCCLELLAND, S. F.; PETRIN, D. P.; GARBER, G. E. Treatment of Infections Caused by Metronidazole-Resistant *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews*, v.17, n.4, p.783-793, 2004.

DE CARLI, G. A. Parasitologia Clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2007.

DA MATTA DA, DE ALMEIDA LP, MACHADO AM, AZEVEDO AC, KUSANO EJ, TRAVASSOS NF, SALOMÃO R, COLOMBO AL. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v.57, n.4, p.399-404, 2007.

- DENNING DW. Equinocandina: drogas antifúngicas. *Lancet*, v.362, p.1142-51, 2003.
- DESSI, D.; DELOGU, G.; EMONTE, E.; CATANIA, M. R.; FIORI, P. L.; RAPPELLI, P. Long-Term Survival and Intracellular Replication of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* Cells: Potential Role of the Protozoon in Transmitting Bacterial Infection. *Infection and Immunity*, v.73, p.1180-1186, 2005.
- DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, v.15, p.167-193, 2002.
- DOYLE, R.J.; ROSENBERG, M. Microbial cell surface hydrophobicity. American Society for Microbiology, Washington, 1990.
- DUARTE, M.; GIORDANI, R.B.; DE CARLI, G.A.; ZUANAZZI, J.A.; MACEDO, A.J.; TASCA, T. A quantitative resazurin assay to determinate the viability of *Trichomonas vaginalis* and the cytotoxicity of organic solvents and surfactant agents *Experimental Parasitology*, v.123, p.195-198, 2009.
- DUNNE, R.L.; DUNN L.A.; UPCROFT, P.; O'DONOGHUE, P.J.; UPCROFT, J.A. Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Cell Research*, v.13, p.239-249, 2003.
- DUREL, P.; COUTURE, J.; BASSOULLET, M.T. The rapid detection of metronidazole in urine. *The British Journal of Venereal Diseases*, v.43, p.111-113, 1967.
- ENGGBRING, J.A.; ALDERETE, J. F. Characterization of *Trichomonas vaginalis* AP33 adhesin and cell surface interactive domains. *Microbiology*, v.144, p.3011-3018, 1998.
- ESPINEL-INGROFF, A. Clinical utility of *in vitro* antifungal susceptibility testing. *Revista Espanhola de Quimioterapia*, v.13, n.2, p.1-7, 2000.
- ESPINEL-INGROFF, A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: Yeasts and filamentous fungi. *Revista Iberoamericana de Micología*, v.25, p.101-106, 2008.
- ESTIVILL, D.; ARIAS, A.; TORRES-LANA, A.; CARRILLO-MUÑOZ, A.J.; ARÉVALO, M.P. Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials. *Journal of Microbiological Methods*, v.86, p.238-242, 2011.
- FANG, S.L.; XIAO, J.C.; LUN, Z.R. Detection of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* by PCR. *Chinese Journal of Parasitology & Parasitic Diseases*, v. 24, p.144-145, 2006.
- FICHOROVA, R. N. Impact of *T. vaginalis* infection on innate immune responses and reproductive outcome. *Journal of Reproductive Immunology*, v.83, p.185-189, 2009.
- FICHOROVA, R.N.; LEE, Y.; YAMAMOTO, H.S.; TAKAGI, H.S.; GARY R. HAYES, G.R.; GOODMAN, R.P.; CHEPA-LOTREA, X.; BUCK, O.R.; MURRAY, R.; KULA, T.; BEACH, D.H.; SINGH, B.N.; NIBERT, M.L. Endobiont Viruses Sensed

by the Human Host -Beyond Conventional Antiparasitic Therapy. *PLOS ONE*, v.7, n.11, p.e48418, 2012.

FIGUEROA-ANGULO, E. E.; RENDÓN-GANDARILLA, F. J.; PUENTE-RIVERA, J.; CALLA-CHOQUE, J. S.; CÁRDENAS-GUERRA, R. E.; ORTEGA-LÓPEZ, J.; QUINTAS-GRANADOS, L. I.; ALVAREZ, M. E. The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *Microbes and Infection*, p.1-17, 2012.

FISHER, J.F.; SOBEL, J.D.; KAUFFMAN, C.A.; NEWMAN C.A. *Candida* Urinary Tract Infections—Treatment. *Clinical Infectious Diseases*, v.52, n.6, p.457–466, 2011.

FLEGR, J.; CERKASOV, J.; STOKROVA, J. Multiple populations of double-stranded RNA in two virus-harboring strains of *Trichomonas vaginalis*. *Folia Microbiologica*, v.33, p.462-465, 1988.

FRAGA, J.; RODRÍGUEZ, N.; FERNÁNDEZ C.; MONDEJA B.; SARIEGO I.; FERNÁNDEZ-CALIENES, A.; ROJAS L. Mycoplasma hominis in Cuban *Trichomonas vaginalis* isolates: Association with parasite genetic polymorphism. *Experimental Parasitology*, v.131, p.393-398, 2012.

FRAGA, J.; ROJAS, L.; SARIEGO, I.; FERNANDEZ-CALIENES, A. Double-stranded RNA viral infection in Cuban *Trichomonas vaginalis* isolates. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v.9, p.521-524, 2005.

GANDER, S. Bacterial biofilms: resistance to antimicrobial agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.37, p.1047-1050, 2004.

GERHOLD, R. W.; ALLISON, A. B.; SELLERS, H.; LINNEMANN, E.; CHANG, T.H.; ALDERETE, J. F. Examination for double-stranded RNA viruses in *Trichomonas gallinae* and identification of a novel sequence of a *Trichomonas vaginalis* virus. *Parasitology Research*, v.105, p.775-779, 2009.

GHABRIAL, S.A. *Totiviruses*. In: Mahy BWJ, Van Regenmortel MHV (eds) *Encyclopedia of Virology*, v.5, 3rd edn. Elsevier, San Diego, p.163–174, 2008.

GHANNOUM, M.A.; RICE, L.B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation do these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, v.12, n.4, p.501-517, 1999.

GILBERT, P.; DAS, J.; IBRAHIM, A.S. Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Advances in Dental Research*, v.11, p. 160-167, 2004.

GIORDANI, R. B.; VIEIRA, P. B.; WEIZENMANN, M.; ROSEMBERG, D. B.; SOUZA, A. P.; BONORINO, C.; DE CARLI, G. A.; BOGO, M. R.; ZUANAZZI, J. A.; TASCA, T. Candimine-induced cell death of the amitochondriate parasite *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Natural Products*, v.73, n.12, p.2019-2023, 2010.

GIORDANI, R. B.; VIEIRA, P. B.; WEIZENMANN, M.; ROSEMBERG, D. B.; SOUZA, A. P.; BONORINO, C.; DE CARLI, G. A.; BOGO, M. R.; ZUANAZZI, J. A.; TASCA, T. Lycorine induces cell death in the amitochondriate parasite, *Trichomonas*

vaginalis, via an alternative non-apoptotic death pathway. *Phytochemistry*, v.72, n.7, p.645-650, 2011.

GOLDSTEIN, F.; GOLDMAN, M. B.; CRAMER, D. W. Relation of tubal infertility to a story of sexually transmitted diseases. *American Journal of Epidemiology*, v. 137, p. 577–584, 1993.

GOODMAN, R. P.; FRERET, T. S.; KULA, T.; GELLER, A. M.; TALKINGTON, M. W. T.; et al. Clinical Isolates of *Trichomonas vaginalis* Concurrently Infected by Strains of Up to Four Trichomonasvirus Species (Family Totiviridae). *Journal of Virology*, v.85, p.4258-4270, 2011b.

GOODMAN, R. P.; GHABRIAL, S. A.; FICHOROVA, R. N.; NIBERT, M. L. Trichomonasvirus: a new genus of protozoan viruses in the family Totiviridae. *Archives of Virology*, v.156, p.171-179, 2011a.

GRAF, B.; ADAM, T.; ZILL, E.; GÖBEL, U.B. Evaluation of the VITEK 2 System for Rapid Identification of Yeasts and Yeast-Like Organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, v.38, n.5, p.1782-1785, 2000.

GULER, S.; URAL, O.; FINDIK, D.; ARSLAN, U. Risk factors for nosocomial candiduria. *Saudi Medical Journal*, v.27, n.11, p.1706-10, 2006.

HAMPL, V.; VAŇÁČOVÁ, S.; KULDA, J.; FLEGR, J. Concordance between genetic relatedness and phenotypic similarities of *Trichomonas vaginalis* strains. *BMC Evolutionary Biology*, p. 1-11, 2001.

HARP, D. F.; CHOWDHURY, I. Trichomoniasis: evaluation to execution. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v.157, p.3-9, 2011.

HAWSER, S.P.; DOUGLAS, L.J. (1995) Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents *in vitro*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.39(9), p.2128-2131, 1995.

HERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, R.; AVILA-GONZÁLEZ, L. A.; ORTEGA-LÓPEZ, J.; CRUZ-TALONIA, F.; GÓMEZ-GUTIERREZ, G.; ARROYOA, R. *Trichomonas vaginalis*: characterization of a 39-kDa cysteine proteinase found in patient vaginal secretions. *Experimental Parasitology*, v. 107, p. 125-135, 2004.

HEYWORTH, P. G.; GUTTERIDGE, W. E.; GINGER, C. D. Purine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *FEBS Letters*, v.141, n.1, p.106-110, 1982.

HEYWORTH, P. G.; GUTTERIDGE, W. E.; GINGER, C. D. Pyrimidine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *FEBS Letters*, v.176, n.1, p.55-60, 1984.

HOLLENBACH, E. To treat or not to treat-critically ill patients with candiduria. *Mycoses*, v.51, p.12-24, 2008.

HONIGBERG, B. M. Taxonomy and nomenclature in: HONIGBERG, B. M. (Ed.), *Trichomonads parasitic in humans*. Springer-Verlag New York; p.3-4, 1990.

- HONIGBERG, B. M.; BRUGEROLLE, G. Structure. In: HONIGBERG, B. M. (Ed.). *Trichomonads Parasitic in Humans*. New York: Springer, p.05-35, 1990.
- HOYLE, B.D.; COSTERTON, J.W. Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Progress in Drug Research.*, v.37, p.91-105, 2004.
- HUGGINS, G. R.; PRETI, G. Vaginal odours and secretions. *Clinical Obstetrics and Gynecology*. v.24, p.355-376, 1981.
- JAYATILAKE, J.A.M.S. A Review of the Ultrastructural Features of Superficial Candidiasis. *Mycopathologia*, v.171, p.235-250, 2011.
- JOHNSTON, V.J.; MABEY, D.C. Global epidemiology and control of *Trichomonas vaginalis*. *Current Opinion in Infectious Disease*, v. 8, p. 56–64, 2008.
- KAYE, D.; HESSEN, M.T. Infections associated with foreign bodies in the urinary tract, p. 291–307. In Bisno, A.L.; Waldvogel, A.F. (ed.), *Infections associated with indwelling medical devices*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C, 1994.
- KANAFANI, Z.A.; PERFECT, J.R. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. *Clinical Infectious Diseases*, v.46, p.120-8, 2008.
- KANG, J. H.; SONG, H. O.; RYU, J. S.; SHIN, M. H.; KIM, J. M.; CHO, Y. S.; ALDERETE, J. F.; AHN, M. H.; MIN, D. Y. *Trichomonas vaginalis* promotes apoptosis of human neutrophils by activating caspase-3 and reducing Mcl-1 expression. *Parasite Immunology*, v. 28, p. 439-446, 2006.
- KAUFFMAN, C. A.; FISHER, J. F.; SOBEL, J. D.; NEWMAN, C. A. *Candida* Urinary Tract Infections: Diagnosis. *Clinical Infectious Diseases*, v.52, n.6, p.452–456, 2011.
- KAUFFMAN, C. A. Candiduria. *Clinical Infectious Diseases*, v.41, p.371-6, 2005.
- KAUFFMAN, C.A.; VAZQUEZ, J.A.; SOBEL, J.D. Multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients. *Clinical Infectious Diseases*, v.30, p.14-18, 2000.
- KHOSHANAN, A.; ALDERETE, J.F. Multiple double-stranded RNA segments are associated with virus particles infecting *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Virology*, v.67, p.6950-6955, 1993.
- KHOSHANAN, A.; ALDERETE, J.F. *Trichomonas vaginalis* with a Double-Stranded RNA Virus Has Upregulated Levels of Phenotypically Variable Immunogen mRNA. *Journal of Virology*, v.68, n.6, p.4035-4038, 1994.
- KIM, J. W.; CHUNG, P. R.; HWANG, M. K.; CHOI, E. Y. Double-stranded RNA virus in Korean Isolate IH-2 of *Trichomonas vaginalis*. *Korean Journal of Parasitology*, v.45(2), p.87-94, 2007.

KIRKCALDY, R.D.; AUGOSTINI, P.; ASBEL, E.L.; BERNSTEIN, K.T.; KERANI, R.P.; METTENBRINK, C.J.; PATHELA, P.; SCHWEBKE, J.R.; SECOR, W.E.; WORKOWSKI, K.A.; DAVIS, D.; BRAXTON, J.; WEINSTOCK, S.H. *Trichomonas vaginalis* Antimicrobial Drug Resistance in 6 US Cities, STD Surveillance Network (2009–2010). *Emerging Infections Diseases*, v.18, p.939-943, 2012.

KLEBANOFF, M. A.; CAREY, J. C.; HAUTH, J. C.; HILLIER, S. L.; NUGENT, R. P.; THOM, E. A.; ERNEST, J. M.; HEINE, R. P.; WAPNER, R. J.; TROUT, W.; MOAWAD, A.; Miodovnik, M.; Sibai, B. M.; Dorsten, J. P. V.; Dombrowski, M. P.; O'Sullivan, M. J.; Varner, M.; Langer, O.; McNellis, D.; Roberts, J. M.; Leveno, K. J. Failure of metronidazole to prevent preterm delivery among pregnant women with asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infection. *The New England Journal of Medicine*, v. 345, p. 487-493, 2001.

KLEPSEK, M. E. Antifungal resistance among *Candida* species. *Pharmacotherapy*, v.21, n.8, p.124-132, 2001.

KNIEL, K. E.; HIGGINS, J.A.; TROUT, J.M.; FAYER, R.; JENKINS, M.C. Characterization and potential use of a *Cryptosporidium parvum* virus (CPV) antigen for detecting *C. parvum* oocysts. *Journal of Microbiological Methods*, v.58, p.189-195, 2004.

KONTOYIANNIS, D. P.; LEWIS, R. E. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet*, v.359, p.1135-1144, 2002.

KRIEGER, J. N.; VERDON, M.; SIEGEL, N.; HOLMES, N. N. Natural history of urogenital trichomoniasis in men. *The Journal of Urology*, v.149, p.1455–1458, 1993.

KUCKNOOR, A. S.; MUNDODI, V.; ALDERETE, J. F. Adherence to human vaginal epithelial cells signals for increased expression of *Trichomonas vaginalis* genes. *Infection and Immunity*, v.73, p.6472-6478, 2005.

KUHN, D.M.; GEORGE, T.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P.K.; GHANNOUM, M.A. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v.46, p.1773-1780, 2002.

KULDA, J. Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *International Journal for Parasitology*, v.29, p.199-212, 1999.

LEHKER, M. W.; ALDERETE, J. F. Biology of trichomonosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v.13, p.37-45, 2000.

LEHKER, M. W.; SWEENEY, D. Trichomonad invasion of the mucous layer requires adhesins, mucinases, and motility. *Sexually Transmitted Infections*, v.75, n.4, p.231-238, 1999.

LEVINE, W. C.; POPE, V.; BHOMKAR, A.; TAMBE, P.; LEWIS, J. S.; ZAIDI, A. A.; FARSHY, C. E.; MITCHELL, S.; TALKINGTON, D. F. Increase in endocervical

- CD4 lymphocytes among women with nonulcerative sexually transmitted diseases. *Journal of Infectious Diseases*, v.177, n.1, p.167-174, 1998.
- LINDMARK, D. G.; ECKENRODE, B. L.; HALBERG, L. A.; DINBERGS, I. D. Carbohydrate, energy and hydrogenosomal metabolism of *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Protozoology*, v.36, p.214-216, 1989.
- LINDMARK, D. G.; MÜLLER, M. Hydrogenosome, a Cytoplasmic Organelle of the Anaerobic Flagellate *Tritrichomonas foetus*, and Its Role in Pyruvate Metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, v.248, n.22, p.7724-7728, 1973.
- LINSTEAD, D. Cultivation. In: HONIGBERG, B. M., ed. *Trichomonads parasitic in humans*. Springer-Verlag, New York. p.91-111, 1990.
- LOEFFLER, J.; STEVENS, D.A. Antifungal drug resistance. *Clinical Infectious Diseases*, v. 36, p.31-41, 2003.
- LU, J.J.; LEE, S.Y.; CHIUEH, T.S. *In vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida* blood isolates and avaluation of the E-test method. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v.37, p.335-42, 2004.
- MACIEL, G. P.; Tasca, T.; DE CARLI, G. A. Aspectos Clínicos, patogênese e diagnóstico de *Trichomonas vaginalis*. *Bras Patol Med Lab*, v.40, n.3, p.152-160, 2004.
- MACK, S. R.; MÜLLER, M. End products of carbohydrate metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *Comparative Biochemistry Pbyysiology*, v.67, p.213-216, 1980.
- MAH, T.F.; O'TOOLE, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, v.9, p.34-39, 2004.
- MCLEAN, R.J.C.; NICKEL, J.C.; OLSON, M.E. 1995. Biofilm associated urinary tract infections, p. 261–273. In LAPPIN-SCOTT, H.M.; COSTERTON, J.W. (ed.), *Microbial biofilms*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- MC CLELLAND, R.S.; SANGARÉ, L.; HASSAN, W.M.; LAVREYS, L.; MANDALIYA, K.; KIARIE, J.; NDINYA-ACHOLA, J.; JAOKO, W.; BAETEN, J. M. Infection with *Trichomonas vaginalis* increases the risk of HIV-1 acquisition. *Journal of Infectious Diseases*, v.195, n.5, p.698-702, 2007.
- MALANI, A.N.; KAUFFMAN, C.A. *Candida* urinary tract infections: treatment options. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, v.5, n.2, p.277-84, 2007.
- MASSONET, C.; ELDERE, J.V.; VANEECHOUTTE, M.; BAERE, T.D.; VERHAEGEN, J.; LAGROU, K. Comparison of VITEK 2 with ITS2-Fragment Length Polymorphism Analysis for Identification of Yeast Species. *Journal of Clinical Microbiology*, v.42, n.5, p.2209-2211, 2004.
- MEADE, J.C.; MESTRAL, J.; STILES, J.K.; SECOR, W.E.; FINLEY, R.W.; CLEARY, J.D.; Lushbaugh, W.B. Genetic diversity of *Trichomonas vaginalis* clinical isolates determined by EcoRI restriction fragment length polymorphism of heat-shock protein 70 genes. *Am J Trop Med Hyg* 80:245-251, 2009.

- MELLADO, E.; CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L. Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v.20, p.523-530, 2002.
- MILLER, M. R.; NYIRJESY, P. Refractory Trichomoniasis in HIV-positive and HIV-negative Subjects. *Current Infectious Disease Reports*, v.13, p. 595-603, 2011.
- MINAGI S, MIYAKE Y, INAGAKI K, TSURU H, SUGINAKA H. Hydrophobic interaction in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* adherence to various denture base resin materials. *Infection and Immunity*, v.47, n.2, p.11-14, 1985.
- MISHRA, N. N.; PRASAD, T.; SHARMA, N.; PAYASI, A.; PRASAD, R.; GUPTA, D. K.; SINGH, R. Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. A review. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, v.54, n.3, p. 201-235, 2007.
- MORENO-BRITO, V.; YÁÑEZ-GÓMEZ, C.; MEZA-CERVANTEZ, P.; GONZÁLEZ, L. A.; RODRÍGUEZ, M. A.; ORTEGA-LÓPEZ, J.; GONZÁLEZROBLES, A.; ARROYO, R. A *Trichomonas vaginalis* 120 kDa protein with identity to hydrogenosome pyruvate:ferredoxin oxidoreductase is a surface adhesin induced by iron. *Cellular Microbiology*, v.7, n.2, p.245-258, 2005.
- MÜLLER, M. Biochemistry of *Trichomonas vaginalis*. In: HONIGBERG, B. M., ed. *Trichomonads parasitic in humans*. Springer-Verlag, New York. p.53-83, 1990.
- MÜLLER, M. The hydrogenosome. *Journal of General Microbiology*, v.139, p.2879-2889, 1993.
- MUNAGALA, N. R.; WANG, C. C. Adenosine is the primary precursor of all purine nucleotides in *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.127, p.143-149, 2003.
- MUKHERJEE, P.K.; ZHOU,G.; MUNYON, R.; GHANNOUM, M.A. *Candida* biofilm: a well-designed protected environment. *Medical Mycology*, v.43, n.3, p.191-208, 2005.
- NIELSEN, M.H.; NIELSEN, R. Electron microscopy of *Trichomonas vaginalis* Donné interaction with vaginal epithelium in human trichomoniasis. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology*, v.83, p.381-389, 1975.
- NOBILE, C.J.; MITCHELL, A.P. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cell Microbiology*, v.8, p.1382-1391, 2006.
- ODDS, F.C.; GOW, N.A.R.; BROWN, A.J.P. Toward a molecular understanding of *Candida albicans* virulence. In *molecular principles of fungal pathogenesis*. Heitman J, Filler G, Edwards JE Jr, Mitchell AP, eds, pp.305-319. ASM Press, Washington DC, 2006.

- OLIVEIRA, N.C.; RAMPAZZO, R.C.P.; MINARI, M.C.; CORRÊA, P.R.C. Use of chromogenic medium and semi-nested PCR-based assay to identify *Candida* species. *Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina, v.27, n.2, p.125-132, 2006.
- PANIZO, M.M.; REVIÁKINA, V.; DOLANDE, M.; SELGRAD, S. *Candida* spp. *in vitro* susceptibility profile to four antifungal agents. Resistance surveillance study in Venezuelan strains. *Medical Mycology*, v.47, v.137-43, 2009.
- PANNANUSORN S, FERNANDEZ V, RÖMLING U. Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of *Candida* species causing bloodstream infection. *Mycoses*, v.56, n.3, p.264-72, 2013.
- PASCUAL, A.; JATON, K.; NINET, B.; BILLE, J.; GREUB, G. New Diagnostic Real-Time PCR for Specific Detection of *Mycoplasma hominis* DNA. *International Journal of Microbiology*, p.1-4, 2010.
- PAUL, V. K.; GUPTA, U.; SINGH, M.; NAG, V. L.; TAKKAR, D.; BHAN, M. K. Association of genital mycoplasma colonization with low birth weight. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, v.63, p.109-114, 1998.
- PEREA, S.; PATTERSON, T.F. Antifungal resistance in pathogenic fungi. *Clinical Infectious Diseases*, v.35, p.1073-1080, 2002.
- PEREIRA-NEVES, A.; BENCHIMOL, M. Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*: new insights. *Biology of the Cell*, v.99, p.87-101, 2007.
- PÉREZ, S.; FERNÁNDEZ-VERDUGO, A.; PÉREZ, F.; VÁZQUEZ, F. Prevalence of 5-nitroimidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* in Oviedo, Spain. *Sexually Transmitted Diseases*, v.28, p.115-116, 2001.
- PERLIN, D.S. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resistance Updates*, v.10, n.3, p.121-130, 2007.
- PETERSON, K. M.; ALDERETE, J. F. Host plasma proteins on the surface of pathogenic *Trichomonas vaginalis*. *Infection and Immunity*, v.37, n.2, p.755-762, 1982.
- PETRIN, D.; DELGATY, K.; BHATT, R.; GARBER, G. Clinical and Microbiological Aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews*, v.11, p.300-317, 1998.
- PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Role of Sentinel Surveillance of Candidemia: Trends in Species Distribution and Antifungal Susceptibility. *Journal of Clinical Microbiology*, v.40, n.10, p.3551-3557, 2002.
- PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*, v.20, p.133-163, 2007.
- PIPERAKI, E. T.; THEODORA, M.; MENDRIS, M.; BARBITSA, L.; PITIRIGA, V.; ANTSAKLIS, A.; TSAKRIS, A. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* infection in

women attending a major gynaecological hospital in Greece: a cross-sectional study. *Journal of Clinical Pathology*, v. 63, p. 249-253, 2010.

PINDAK, F.F.; PINDAK, M.; HYDE, B.M.; GARDNER, W.A. Acquisition and retention of viruses by *Trichomonas vaginalis*. *Genitourinary Medicine*, v.65, n.6, p.366-71, 1989.

PROVENZANO, D.; ALDERETE, J.F. Analysis of human immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis*. *Infection and Immunity*, v.63, p.3388-3395, 1995.

PROVENZANO, D.; KHOSHANAN, A.; ALDERETE, J.F. Involvement of dsRNA virus in the protein composition and growth kinetics of host *Trichomonas vaginalis*. *Archives of Virology*, v.142, p.939-952, 1997.

QUINLIVAN, E. B.; PATEL, S. N.; GRODENSKY, C.A.; GOLIN, C. E.; TIEN, H.; HOBBS, M. M. Modeling the Impact of *Trichomonas vaginalis* Infection on HIV Transmission in HIV-Infected Individuals in Medical Care. *Sexually Transmitted Diseases*, v. 39, n.9, p. 671-677, 2012.

RAD, M.M.; ZAFARGHANDI, S.; ABBASABADI, B.; TAVALLAEE, M. The epidemiology of *Candida* species associated with vulvovaginal candidiasis in an Iranian patient population. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v.155, p.199-203, 2011.

RAMAGE G, RAJENDRAN R, SHERRY L, WILLIAMS C. Fungal Biofilm Resistance. *International Journal of Microbiology*, 2012.

RAMAGE, G.; SAVILLE, S.P.; THOMAS, D.P.; LÓPEZ-RIBOT, J.L. *Candida* Biofilms: an Update. *Eukaryotic Cell*, v.4, n.4, p.633-638, 2005.

RAMAGE, G.; TOMSETT, K.; WICKES, B.L.; LÓPEZ-RIBOT, J.L.; REDDING, S.W. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics*, v.98, n.1, p.53-9, 2004.

RAMAGE, G.; WALLE, K.V.; WICKES, B.L.; LÓPEZ-RIBOT, J.L. Standardized Method for *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.45(9), 2475-2479, 2001a.

RAMAGE, G.; WALLE, K.; LÓPEZ-RIBOT, J.L. Biofilm formation by *Candida dubliniensis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.39(9), p.3234-3240, 2001b.

RAPPELLI, P.; ADDIS, M.F.; CARTA, F.; FIORI, P.L. *Mycoplasma hominis* parasitism of *Trichomonas vaginalis*. *Lancet* 352, 1286, 1998.

RAPPELLI, P.; FRANCO, C.; GIUSEPPE, D.; ADDIS, M.F.; DESSÌ, D.; PIERO, C.; FIORI, P.L. *Mycoplasma hominis* and *Trichomonas vaginalis* symbiosis:

multiplicity of infection and transmissibility of *M. hominis* to human cells. *Archives of Microbiology*, v.175, p.70-74, 2001.

RASOLOSON, D.; VANACOVÁ, S.; TOMKOVÁ, E.; RÁZGA, J.; HRDÝ, I.; TACHEZY, J.; KULDA, J. Mechanisms of *in vitro* development of resistance to metronidazole in *Trichomonas vaginalis*. *Microbiologia*, v. 148, p. 2467-2477, 2002.

RENDÓN-MALDONADO, J.; ESPINOSA-CANTELLANO, M.; SOLER, C.; TORRES, J.V.; MARTÍNEZ-PALOMO, A. *Trichomonas vaginalis*: *in vitro* attachment and internalization of HIV-1 and HIV-1-infected lymphocytes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v.50, n.1, p.43-8, 2003.

REX JH, BENNETT JE, SUGAR AM, PAPPAS PG, SERODY J, EDWARDS JE, WASHBURN RG. Intravascular catheter exchange and duration of candidemia. NIAID Mycoses Study Group and the Candidemia Study Group. *Clinical Infectious Diseases*, n.21, p.4, p.994-6, 1995.

RIBEIRO, P.M.; KOGA ITO, C.Y.; JUNQUEIRA, J.C.; JORGE, A.O.C. Isolation of *Candida* spp. using of the chromogenic culture medium CHROMagar Candida. *Brazilian Dental Science*, v.12, n.4, p.40-45, 2009.

RODRIGUES, D.; MEZZARI, A.; FUENTEFRIA, A.M. Candiduria: up-to-date review. *Revista Brasileira em Promoção da Saúde*, v.24, n.2, p.142-150, 2011.

ROWBOTHAM, T. J. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *Journal of Clinical Pathology*, v.33, p.1179-1183, 1980.

SANGLARD, D. Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeast. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v.20, n.9, p.462-470, 2002.

SCHWEBKE, J.R.; BARRIENTES, F.J. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* Isolates with Resistance to Metronidazole and Tinidazole. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, v. 50, n.12, p. 4209-4210, 2006.

SCHWEBKE, J.R.; BURGESS, D. Trichomoniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, v.17, p.794-803, 2004.

SENEVIRATNE, C.J.; JIN, L.; SAMARANAYAKE, L.P. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral Diseases*, v.14, p.582-590, 2008.

SEXUALLY TRANSMITTED DISEASES TREATMENT GUIDELINES, 2010. Available at <http://www.cdc.gov/std/treatment/2010/vaginal-discharge.htm#a2>. Accessed Jan 2012.

SILVA, C.H.P.M.; LINS, A.P.; SOUZA, D.R.; CRUZ, C.S.O.; BERGAMASCHI, G.C. Development and evaluation of a chemical preservative for microbiological and routine urinalysis of urine samples. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v.37, n.3, p.137-147, 2005.

SILVA, S.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.; AZEREDO, J. In Vitro Biofilm Activity of Non-*Candida albicans* *Candida* Species. *Current Microbiology*, v.61, p.534-540, 2010.

SNIPES, L. J.; GAMARD, P.M.; NARCISI, E. M.; BEARD, C.B.; LEHMANN, T.; SECOR, W. E. Molecular epidemiology of metronidazole resistance in a population of *Trichomonas vaginalis* clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, v.38, p.3004-3009, 2000.

STICKLER, D. Biofilms. *Curr. Opin. Microbiol.*, v.2, p.270-275, 2004.

SOBEL, J.D.; FISHER, J. F.; KAUFFMAN, C.A.; NEWMAN, C. A. *Candida* Urinary Tract Infections: Epidemiology. *Clinical Infectious Diseases*, v.52, n.6, p.433-436, 2011.

SOBEL, J.D.; KAUFFMAN, C.A.; MCKINSEY, D.; ZERVOS, M.; VAZQUEZ, J.A.; KARCHMER, A.W.; LEE, J.; THOMAS, C.; PANZER, H.; DISMUKES, W.E. Candiduria: a randomized, doubleblind study of treatment with fluconazole and placebo. *Clinical Infectious Diseases*, v.30, p.19-24, 2000.

SORVILLO, F.; SMITH, L.; KERNDT, P.; ASH, L. *Trichomonas vaginalis*, HIV, and Africans. *Emerging Infectious Disease*, v.7, p.927-932, 2001.

STICKLER, D.J. Bacterial biofilms and the encrustation of urethral catheters. *Biofouling*, v.94, p.293-305, 1996.

SU, H.M.; TAI, J.H. Genomic organization and sequence conservation in type I *Trichomonas vaginalis* viruses. *Virology*, v.222, p.470-463, 1996.

SUTCLIFFE, S.; NEACE, C.; MAGNUSON, N. S.; REEVES, R.; ALDERETE, J.F. Trichomonosis, a Common Curable STI, and Prostate Carcinogenesis: A Proposed Molecular Mechanism. *PLoS Pathogens*, v.8, 2012.

TOBUDIC, S.; KRATZER, C.; LASSNIG, A., GRANINGER, W.; PRESTERL, E. *In vitro* activity of antifungal combinations against *Candida albicans* Biofilms. *Journal of Antimicrobiology Chemotherapy*, v.65, p.271-274, 2010.

UPPULURI, P.; DINAKARAN, H.; THOMAS, D.P.; CHATURVEDI, A.K.; LOPEZ-RIBOT, J.L. Characteristics of *Candida albicans* Biofilms Grown in a Synthetic Urine Medium. *Journal of Clinical Microbiology*, v.47, n.12, p.4078-4083, 2009.

VAN BELKUM, A.; SCHEE, C.; MEIJDEN, W. I.; VERBRUGH, H. A.; SLUITERS, H. J. F. A clinical study on the association of *Trichomonas vaginalis* and *Mycoplasma hominis* infections in women attending a sexually transmitted disease (STD) outpatient clinic. *Immunology and Medical Microbiology*, v.32, p.27-32, 2001.

VAN DER POL, B.; KWOK, C.; PIERRE-LOUIS, B.; RINALDI, A.; SALATA, R. A.; CHEN, P. L.; VAN DE WIJGERT, J.; MIRO, F.; MUGERWA, R.; CHIPATO, T.; MORRISON, C. S. *Trichomonas vaginalis* infection and human immunodeficiency virus acquisition in African women. *The Journal of Infectious Disease*, v.197, p.548-554, 2008.

- VAN DER SCHEE, C.; SLUITERS, J.F.; VAN DER MEIJDEN, W.I.; VAN BEEK, P.; PEERBOOMS, P.; VERBRUGH, H.A.; VAN BELKUM, A. Host and pathogen interaction during vaginal infection by *Trichomonas vaginalis* and *Mycoplasma hominis* or *Ureaplasma urelyticum*. *Journal of Microbiology Methods*, v.45, p.61-67, 2001.
- VANCINI, R. G.; BENCHIMOL, M. Entry and intracellular location of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis*. *Archives of Microbiology*, v.189, p.7-18, 2008.
- VATANSHENASSAN, M.; REZAEI, S.; MOHEBALI, M.; NIROMAND, N.; KAZEMI, B.; BABAEI, Z.; REZAEIAN, M. *Trichomonas vaginalis*: Investigation of a novel diagnostic method in urine samples using cysteine proteinase 4 gene and PCR technique. *Experimental Parasitology*, v.126, p.187-190, 2010.
- VENKATESH, M.; RONG, L.; RAAD, I.; VERSALOVIC, J. Novel synergistic antibiofilm combinations for salvage of infected catheters. *Journal of Medical Microbiology*, v.58, p.936-944, 2009.
- VIIKKI, M.; PUKKALA, E.; NIEMINEN, P.; HAKAMA, M. Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. *Acta Oncologica*, v.39, p.71-75, 2000.
- VOOLMANN, T.; BOREHAN, P. Metronidazole resistant *Trichomonas vaginalis* in Brisbane. *Medical Journal of Australia*, p.159-140, 1993.
- WANG, A.L.; WANG, A.C.; ALDERETE, J.F. *Trichomonas vaginalis* phenotypic variation occurs only among trichomonads infected with the double-stranded RNA virus. *The Journal of Experimental Medicine*, v.166, p.142-150, 1987.
- WANG, A.L.; WANG, C.C. A linear double-stranded RNA in *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Biological Chemistry*, v.260, p.3697-3702, 1985.
- WANG, A.L.; WANG, C.C. The double-stranded RNA in *Trichomonas vaginalis* may originate from virus-like particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v.83, p.7956-7960, 1986.
- WANG, A.L.; YANG, H.M.; SHEN, K.A.; WANG, C.C. Giardavirus double-stranded RNA genome encodes a capsid polypeptide and a gag-pol-like fusion protein by a translation frameshift. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v.90, p.8595-8599, 1993.
- WEBER, B.; MAPEKA T. M.; MAAHLO, M.A.; HOOSEN, A.A. Double stranded RNA virus in South African *Trichomonas vaginalis* isolates. *Journal of Clinical Pathology*, v.56, p.542-543, 2003.
- WENDEL, K.; ROMPALO, A.; ERBELDING, E.; CHANG, T. H.; ALDERETE, J. F. Double-stranded RNA viral infection of *Trichomonas vaginalis* infecting patients attending a sexually transmitted diseases clinic. *Journal of Infectious Diseases*, v.186, p.558-561, 2002.

WHITE, T.C.; MARR, K.A.; BOWDEN, R.A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, v.11, n.2, p. 382-402, 1998.

WILLIAMS, D.W.; LEWIS, M.A. Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. *Oral Diseases*, v.6, p.3-11, 2000.

WIDMER, G.; COMEA, A.M.; FURLONG, D.B.; WIRTH, D.; PATTERSON, J.L. Characterization of a RNA virus from the parasite *Leishmania*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v.86, p.5979-5982, 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections. World Health Organization, 2012.


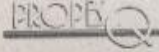
YÜCESOY, M.; MAROL, S. Performance of CHROMAGAR Candida and BIGGY Agar for identification of yeast species. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v.2, p.1-7, 2003.

XIAO, J. C.; XIE, L. F.; FANG, S. L.; GAO, M. Y.; ZHU, Y.; SONG, L. Y.; ZHONG, H. M.; LUN, Z. R. Symbiosis of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* may link metronidazole resistance *in vitro*. *Parasitology Research*, v.100, p. 123-130, 2006.

XIAO, J.C.; XIE, L.F.; ZHAO, L.; FANG, S.L.; LUN, Z.R. The presence of *Mycoplasma hominis* in isolates of *Trichomonas vaginalis* impacts significantly on DNA fingerprinting results. *Parasitology Research*, v.102, p.613-619, 2008.

ZIMAKOFF, J.; PONTOPPIDAN, B.; LARSEN, S.O.; STICKLER, D.J. Management of urinary bladder function in Danish hospitals, nursing homes and home care. *Journal of Hospital Infection*, v.24, p.183-199, 1993.

III.5.1. Carta de aprovação do Comitê de Ética da UFRGS

 **UFRGS** **PRÓ-REITORIA DE PESQUISA** 
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL **Comitê De Ética Em Pesquisa Da Ufrgs**

CARTA DE APROVAÇÃO

Comitê De Ética Em Pesquisa Da Ufrgs analisou o projeto:


Número: 18923
Título: Diagnóstico laboratorial de tricomonose e candidíase em serviços de saúde pública em Porto Alegre, RS: prevalência e perfil de sensibilidade a fármacos

Pesquisadores:
Equipe UFRGS:

TIANA TASCA - coordenador desde 15/05/2010
ALEXANDRE MENEGHELLO FUENTEFRIA - pesquisador desde 15/05/2010
MARIANA DICKI FREITAS - Aluno de Graduação desde 15/05/2010

Comitê De Ética Em Pesquisa Da Ufrgs aprovou o mesmo, em reunião realizada em 11/11/2010 - Sala de Reuniões do Gabinete do Reitor (Ex Salão Vermelho) - Prédio Reitoria, 6º andar, por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alêgre, Quinta-Feira, 11 de Novembro de 2010


JOSE ARTUR BOGO CHIES
Coordenador da comissão de ética