

**Pontifícia Universidade Católica do Paraná**  
**Escola de Saúde e Biociências**  
**Programa de Pós-Graduação em Odontologia**  
**Área de Concentração: Biociências**

**Alinne Ulbrich Mores Rymovicz**

**Modulação de virulência de biofilme de *Candida*  
*albicans* por etinilestradiol+drosiprenona**

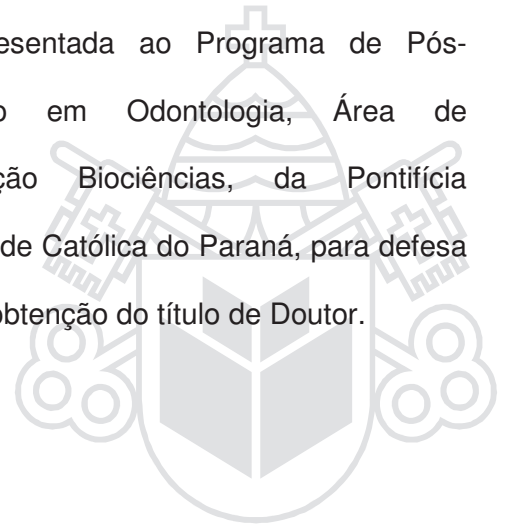
**Curitiba**  
**2015**



**Pontifícia Universidade Católica do Paraná**  
**Escola de Saúde e Biociências**  
**Programa de Pós-Graduação em Odontologia**  
**Área de Concentração: Biociências**

**Modulação de virulência de biofilme de *Candida albicans* por etinilestradiol+drospirenona**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de concentração Biociências, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para defesa pública e obtenção do título de Doutor.



**Curitiba, Dezembro de 2015**

Dados da Catalogação na Publicação  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR  
Biblioteca Central

R995m  
2015 Rymovicz, Alinne Ulbrich Mores  
Modulação de virulência de biofilme de *Candida albicans* por etinilestradiol+  
drospirenona / Alinne Ulbrich Mores Rymovicz ; orientador, Edvaldo Antonio  
Ribeiro Rosa. – 2015.  
27 f. : il. ; 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba,  
2015.

Bibliografia: f. 20-23

1. Biofilme. 2. *Candida albicans*. 3. Anticoncepcionais orais. 4. Enzimas  
proteolíticas. 4. Odontologia. I. Rosa. Edvaldo Antonio Ribeiro. II. Pontifícia  
Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação Odontologia.  
III. Título.

CDD 22. ed. – 617.6

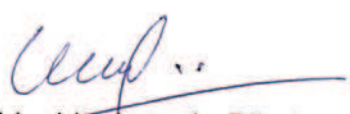
## TERMO DE APROVAÇÃO

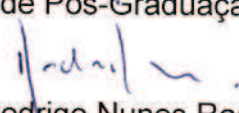
ALINNE ULBRICH MORES RYMOVICZ

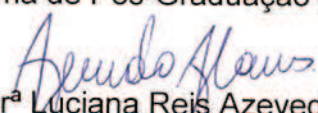
### MODULAÇÃO DE VIRULÊNCIA DE BIOFILME DE CANDIDA ALBICANS POR ETINILESTRADIOL+DROSPIRENONA


Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de **Doutor em Odontologia**, Área de Concentração em **Biociências**.

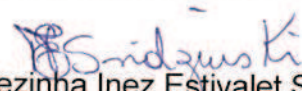
Orientador (a):

  
Prof. Dr. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

  
Prof. Dr. Rodrigo Nunes Rached  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

  
Profª Drª Luciana Reis Azevedo Alanis  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

  
Profª Drª Cristiane Yumi Koga Ito  
Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, UNESP

  
Profª Drª Terezinha Inez Estivalet Svidzinski  
Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, UEM

Curitiba, 18 de dezembro de 2015.

*“ Bem aventurado o homem que encontra sabedoria,  
e o homem que adquire o conhecimento,  
pois são mais proveitosos do que a prata,  
e dão mais lucro do que o ouro.”*

Provérbios 3:13-14

## AGRADECIMENTOS

...à **Deus**

Que tem guiado e conduzido os meus passos, que tem me permitido ir além do que eu imaginava ou sonhava, por ter me permitido chegar até aqui e ter me concedido mais uma vitória. Vitória que é para a Tua honra e glória. A Ti meu amor e eterna gratidão.

...ao meu **esposo Paulo** e minha **filha Sarah**

Pelo constante amor, carinho, apoio e compreensão, a vocês presentes de Deus, família preciosa que faz dos meus dias mais felizes e sempre estão ao meu lado, que fazem todo meu esforço valer à pena. Amo vocês para sempre.

...aos meus pais **Dirceu** e **Lucimari** e irmãs **Thagiane** e **Tayrini**

Pelo incentivo, que mesmo longe torcem e oram por mim. Amo vocês.

...ao meu querido mestre e orientador **Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa**

Que ao longo desses 10 anos sempre acreditou em mim, obrigada pela amizade, confiança e ensinamentos. Obrigada por investir na minha vida e me mostrar que vale a pena subir cada degrau. Mais uma conquista ao seu lado. Meu muitíssimo obrigada.

...aos colegas de doutorado e a **Rosimeire Takaki Rosa**

Pela colaboração direta e indireta, pela ajuda, amizade, conselhos e companheirismo.

## Resumo

É estimado que aproximadamente 103 milhões de mulheres em todo o mundo fazem uso de contraceptivo oral combinado (COC). Nos EUA, o mercado de COC contendo etinilestradiol+drosipirenona (EE+DRSP) movimentou cerca de U\$616 milhões, em 2008. Existem indícios de que contraceptivos aumentem a virulência de *Candida albicans*; contudo, a modulação de virulência fúngica por drosipirenona permanece desconhecida. O objetivo deste trabalho foi avaliar se fatores de virulência são incrementados quando *C. albicans* é exposta à EE+DRSP. As cepas ATCC®90028™, SC5314 e 15A2 foram cultivadas na presença de EE+DRSP nas concentrações 10 nM:10 µM, 50 nM:50 µM e 100 nM:100 µM, sob fluxo contínuo, em biorreator para biofilmes sobre papel. Biofilmes com 72 h foram avaliados quanto a sua capacidade proteolítica, produção de biomassa (ensaio de redução de MTT), indução de formação de tubo-germinativo e medida de invasão de ágar. Somente EE+DRSP 50 nM:50 µM causou reduções nas biomassas dos biofilmes ( $p=0,023$ ); os demais não promoveram qualquer alteração ( $p>0,05$ ). A exposição ao contraceptivo não foi suficiente para causar qualquer incremento na indução de tubos germinativos ( $p>0,05$ ). Houve redução na capacidade de invasão por hifas do tipo concentração-dependente inversa. Por outro lado, o aumento da concentração incorreu em elevação da proteólise ( $p<0,01$ ). A atividade proteolítica se elevou de forma concentração-dependente. Quando expostas ao EE+DRSP, cepas de *C. albicans* não formam maiores quantidades de biofilme, tampouco geram mais tubos germinativos ou se tornam mais invasivas; porém, secretam maiores quantidades de proteases, que facilitam a adesão e invasão dos tecidos, conferindo maior agressividade ao fungo.

**Palavras-chaves:** Biofilme, *Candida albicans*, Contraceptivo oral, Drosipirenona, Protease

## **Abstract**

It is estimated that approximately 103 million women worldwide use combined oral contraceptive (COC). In United States, products containing ethinylestradiol+drospirenone (EE+DRSP) moved about US\$ 616 million in 2008. There are evidences that contraceptives increase the virulence of *Candida albicans*. However, modulation of fungal virulence by drospirenone-containing COC remains unknown. The objective of this study was to evaluate whether virulence factors are increased when *C. albicans* is exposed to EE+DRSP. The ATCC<sup>®</sup>90028<sup>™</sup>, SC5314 and 15A2 strains were grown in the presence of EE+DRSP at 10 nM:10 μM, 50 nM:50 μM, and 100 nM:100 μM under continuous flow in a dedicated bioreactor for biofilm growth. 72-h biofilms were evaluated in relation to their proteolytic capacities, biomass production (MTT reduction assay), and induction of germ-tube formation and measurements of agar invasion. Only 50 nM:50 μM EE+DRSP caused reductions in biomass ( $p=0.023$ ); the other did not promote any change ( $p>0.05$ ). The contraceptive exposure was insufficient to cause any increase in germ tubes induction ( $p>0.05$ ). There was a concentration-dependent increment in the hyphae invasiveness. On the other hand, the proteolytic activity increased in a concentration-dependent manner ( $p<0.01$ ). When exposed to EE+DRSP, *C. albicans* strains do not form greater amounts of biofilm, neither generate more germ tubes, nor become more invasive; however, they secrete greater quantities of proteases, which facilitate the adhesion and invasion of tissue.

**Key-words:** Biofilms, *Candida albicans*, Drospirenone, Oral Contractive, Protease



## ÍNDICE

Resumo .....	v
Abstract .....	vi
1 INTRODUÇÃO.....	09
2 MATERIAL & MÉTODOS .....	10
2.1 Cepas de <i>Candida albicans</i> .....	10
2.2 Compostos esteroides.....	10
2.3 Adaptação celular .....	10
2.4 Formação de biofilmes aeróbios em fluxo dinâmico .....	11
2.5 Quantificações de fatores de virulência .....	11
2.5.1 Secreção de proteases .....	11
2.5.2 Estimativa de biomassa .....	12
2.6 Indução de formação de tubo-germinativo .....	13
2.7 Medida de invasão de ágar .....	14
2.8 Estatística .....	14
3 RESULTADOS .....	15
4 DISCUSSÃO .....	16
5 CONCLUSÃO .....	19
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	20
7. FÍGURAS .....	24

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>COC</b>	Contraceptivo oral combinado
<b>DRSP</b>	Drospirenona
<b>EE</b>	Etinilestradiol
<b>SDB</b>	Caldo Sabouraud Dextrose
<b>PEBR</b>	Biorreator para biofilmes sobre papel
<b>BSA</b>	Albumina bovina
<b>MTT</b>	3(4,5 dimetiliazol – 2- Yl) – 2,5 – difeniltetrazolium bromide
<b>YPD</b>	Yeast Peptone Dextrose
<b>APE</b>	Atividade proteolítica específica

## 1 INTRODUÇÃO

É estimado que aproximadamente 103 milhões de mulheres com idades variando entre 15-49 anos fazem uso de contraceptivos orais combinados (COC), em todo o mundo [1]. Nos Estados Unidos, é o método escolhido por pelo menos 17,3% das mulheres na faixa de 15-44 anos de idade [2] e o mercado de COC contendo etinilestradiol+drospirenona (EE+DRSP) movimentou cerca de U\$616 milhões, em 2008 [3]. Na Grã-Bretanha, 16% das mulheres entre 16-49 anos fazem uso de COC [4]. No Japão, 1,3% das mulheres na mesma faixa etária os utilizam [5]. No Brasil, dentre as mulheres vivendo em alguma forma de união, 81% usavam COC como recurso anticoncepcional [6].

Esses fármacos são utilizados ao longo da vida fértil feminina, o que implica em exposição quase que continuada aos análogos hormonais em concentrações muito superiores àquelas consideradas fisiológicas. Sob a óptica terapêutica, a manutenção dessas altas concentrações garante a suspensão temporária da ovulação, mas também pode incorrer em efeitos colaterais. Um dos menos prospectados é a modulação da virulência microbiana. É sabido que microrganismos diversos como *Trichomonas vaginalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* possuem receptores rudimentares, chamados de proteínas ligantes de estrógeno [7,8,9,10]. No tocante ao último microrganismo, é sabido que a transição morfogênica de levedura para hifa é influenciada pelo estrógeno, com aumento na taxa de formação de tubos germinativos *in vitro* [11], bem como no comprimento desses [9].

Alguns esteroides foram avaliados quanto à capacidade de indução de produção de tubo germinativo são beta-estradiol, alfa-estradiol, estriol, etinilestradiol, colesterol e testosterona [9,11]. Outros esteroides empregados como agentes

contraceptivos carecem de avaliação. Um desses esteroides que vem sendo empregados em várias formulações comerciais é a drospirenona (DRSP).

A possibilidade de modulação de virulência fúngica por DRSP permanece desconhecida. Por isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar se fatores de virulência como formação de biofilme, secreção de proteases, indução de formação de tubo-germinativo e medida de invasão de ágar são incrementados quando o fungo é exposto a etinilestradiol+drospirenona.

## **2 MATERIAL & MÉTODOS**

### **2.1 Cepas de *C. albicans***

Foram empregadas as cepas-referência ATCC<sup>®</sup>90028<sup>™</sup> e SC5314 [12], e 15A2, oriunda de bolsa periodontal  $\geq 3,0$  mm [13].

### **2.2 Compostos esteroides**

Uma solução-estoque contendo etinilestradiol (EE; CAS 57-63-6) 1  $\mu$ M e drospirenona (DRSP; CAS 67392-87-4) 1 mM foi preparada em metanol. As diluições de trabalho contendo EE+DRSP foram preparadas nas concentrações 10 nM:10  $\mu$ M (concentração sub-farmacológica), 50 nM:50  $\mu$ M (concentração farmacológica) e 100 nM:100  $\mu$ M (concentração suprafarmacológica). Para essas diluições, foi empregado o Caldo Sabouraud Dextrose (SDB) esterilizado em autoclave e como controle o meio de cultura sem o esteroide.

### **2.3 Fase de adaptação celular**

As três cepas foram crescidas em SDB (controle) e SDB suplementado com o EE+DRSP nas diferentes concentrações (grupos experimentais) e incubadas a 37 °C, por 72 h em 200 rpm e normóxia (N<sub>2</sub> 80%+O<sub>2</sub> 20%). As células foram colhidas por centrifugação (5000  $\times g$ ) e lavadas três vezes com NaCl 145 mM estéril. Então,

foram ressuspensas em NaCl 145 mM estéril até  $ca. 3 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup> (OD<sub>600</sub> = 0,5) e utilizadas imediatamente.

#### **2.4 Formação de biofilmes sob fluxo dinâmico**

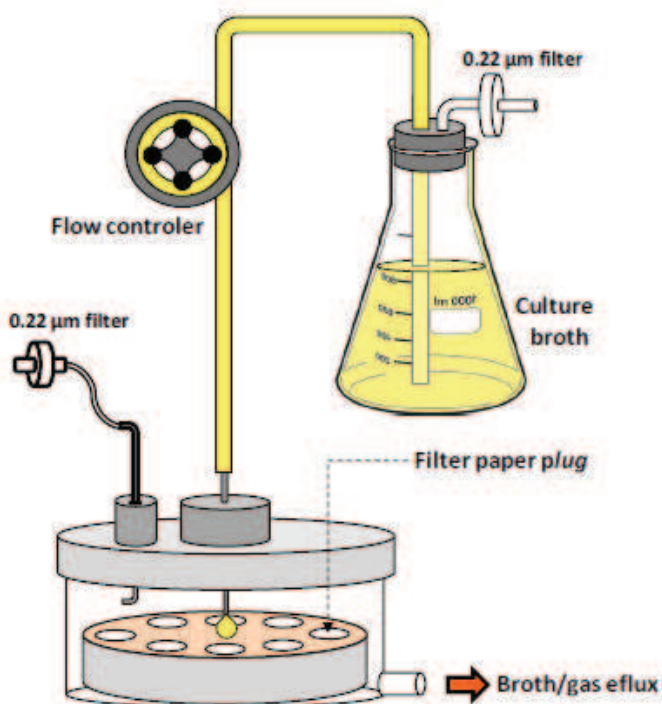
Um disco de papel-filtro de 80 mm foi esterilizado em autoclave e seco em estufa. Sobre ele foram dispensados 30 discos estéreis de antibiograma de 0,5 mm (Cefar Diagnóstica Ltda, São Paulo, Brasil), de forma a cobrir sua periferia, mas sem sobreposição. Nesses discos de antibiograma foram colocados 10 µL de suspensões padronizadas crescidas em presença de EE+DRSP ou controle.

Esse conjunto foi inserido em biorreatores para biofilmes sobre papel (PEBR) [14] (Figura 1) que receberam fluxo contínuo de SDB para o grupo controle e SDB+EE+DRSP, para os grupos experimentais nas diferentes concentrações, na vazão  $ca. 100 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$  (4 gotas.min<sup>-1</sup>). Os discos foram incubados a 37 °C, por 72 h.

#### **2.5. Secreção de proteases**

Após a incubação, os sistemas foram desmontados e 15 discos de cada biorreator foram removidos e inseridos verticalmente em microtubos de 1,5 mL. Os microtubos foram preenchidos com 800 µL de solução contendo BSA 0,2 mg.mL<sup>-1</sup>, tampão citrato de sódio 10 nM e ácido cítrico 10 nM (pH 5,0), e foram incubados a 37 °C, por 4 h e 100 rpm. Decorrido o tempo de digestão, alíquotas de 100 µL dos sobrenadantes foram combinadas com 100 µL de solução Coomassie (Coomassie Brilliant G-250 0,025%, etanol 11,75%, ácido fosfórico 21,25%) em placas de microtitulação de fundo chato de 96 poços. Após 5 min, as densidades ópticas das misturas foram determinadas em 540 nm. Como controles, foram utilizadas as soluções de Coomassie com salina (*blank*) e BSA/citrato com Coomassie (*basal concentration*).

Uma unidade enzimática foi arbitrariamente determinada como sendo a quantidade de enzima capaz de promover a digestão de um micrograma de BSA, por mililitro, por minuto. Unidades de atividade proteolítica pela absorbância da redução MTT (abaixo) foram tomadas como atividade proteolítica específica [15].



**Figura 1.** Biorreator para Biofilmes sobre Papel (PEBR)

## 2.6 Estimativa da biomassa

Após o término da incubação, com os sistemas desmontados, outros 15 de cada biorreator discos foram removidos e inseridos verticalmente em microplaca de fundo U de 96 poços. Os poços foram preenchidos com 100 µL de MTT 1 mg.min<sup>-1</sup> a cada poço teste, assim como aos poços–controle, que continham discos estéreis sem biofilme. As placas foram incubadas no escuro, a 37 °C, por 4 h e 100 rpm. Após a incubação, o MTT não reativo foi drenado por aspiração e 200 µL de álcool isopropílico foram acrescentados. Passados 5 min, 100 µL do sobrenadante foram

transferidos para microplaca de fundo chato de 96 poços e as absorvâncias foram medidas em 540 nm.

## **2.7 Indução de formação de tubo-germinativo**

Alíquotas de 10 µL das suspensões celulares padronizadas foram inoculadas em YPD-ágar e, após crescimento, uma única colônia de cada uma das cepas crescida foi inoculada em 15 mL de meio completo SDB e cultivada durante 16 h a 37 °C, com agitação de 200 rpm. As células foram lavadas três vezes com NaCl 145 mM estéril e contadas usando um hemacitômetro de Neubauer modificado (Inlab Conf., São Paulo, Brasil). As células foram inoculadas, com uma densidade de  $5 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> em 15 mL de BSA-SDB com ou sem EE+DRSP e pré-aquecido a 37 °C. As culturas foram incubadas por 5 h, a 37 °C e 200 rpm. As células foram fixadas em glutaraldeído 1% (vol/vol) e coradas com azul de lactofenol.

A porcentagem de formação de tubo germinativo foi determinada microscopicamente pela avaliação de 100 células por cultura. Os tubos germinativos com comprimentos iguais ou maiores que as células-mãe foram medidos microscopicamente utilizando um micrômetro acoplado à ocular de microscópio Nikon LabOPhot-2 (Nikon Co., Tokyo, Japan).

Dois observadores conduziram as contagens e a concordância intra-observador (Obs<sub>1</sub>, *Kappa*=0,85; Obs<sub>2</sub>, *Kappa*=0,88) e inter-avaliador (*Kappa*=0,87) pelo teste de concordância de *Kappa*; os valores encontrados mostram alta concordância. Cem células foram aleatoriamente medidas para cada cultura/tratamento e três repetições foram feitas para cada condição de cultura. As médias aritméticas de comprimento dos tubos foram calculadas e comparadas entre os diferentes tratamentos.

## **2.8 Medida da invasão de ágar**

Alíquotas de 5 µL de suspensões adaptadas de *C. albicans* SC5314 foram dispensadas sobre meio de cultura em 10 pontos diferentes na placa de Petri contendo glucose 2%, ágar-ágar 1,5%, BSA 1% e EE+DRSP nas concentrações 10 nM:10 µM, 50 nM:50 µM ou 100 nM:100 µM, em triplicata. O volume de meio de cultura em cada placa era ca. 25mL, para que a formação de hifas invasivas fosse perceptível. As placas foram seladas com filme plástico para evitar ressecamento e incubadas estaticamente a 37 °C em atmosfera normóxica, por 14 dias.

Como controle, foi empregado o mesmo meio de cultura sem adição de EE+DRSP.

Decorrido o tempo de incubação-invasão, as colônias foram removidas com lenço de papel. Uma vez limpos os meios de cultura, os halos de invasão foram medidos com paquímetro digital, nas orientações cardinais N-S e L-O. foram usados os valores médios de seis leituras.

## **2.9 Estatística**

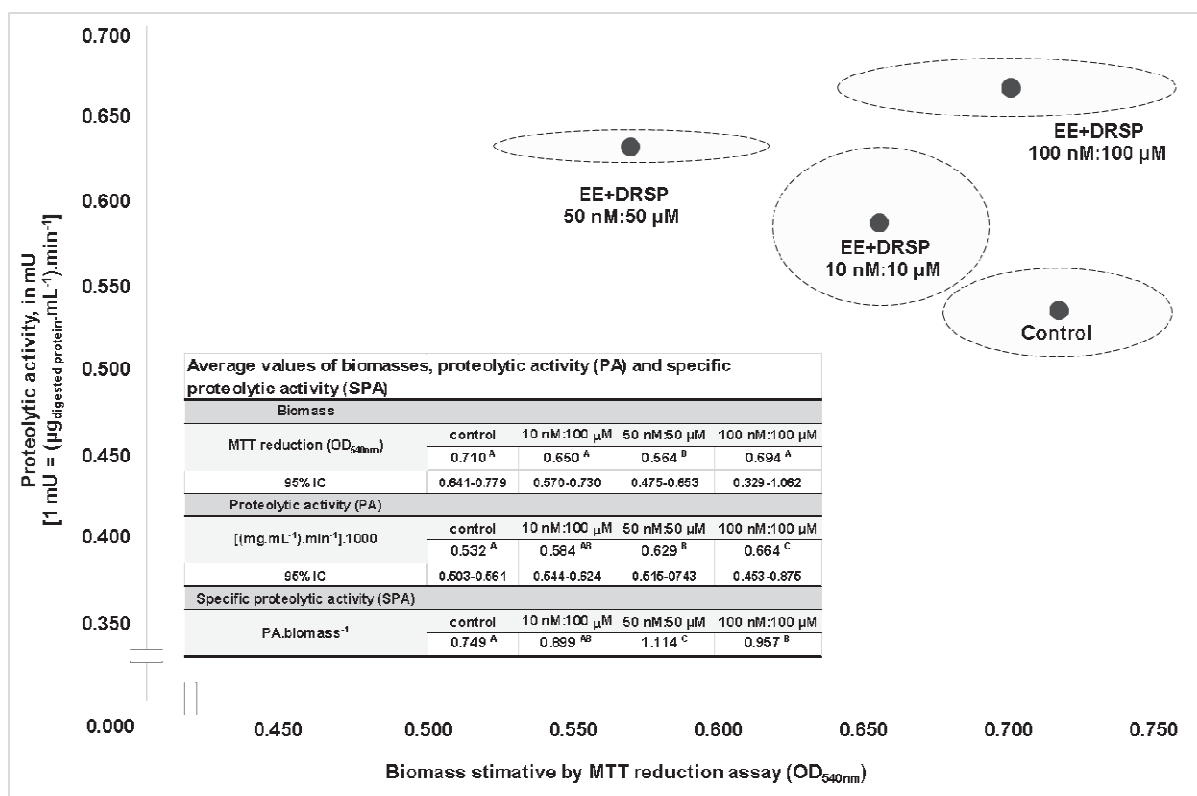
Os dados das medições de biomassa, atividade proteolítica, formação de tubo germinativo e invasibilidade foram testados quanto à sua normalidade de distribuição pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Como as distribuições foram consideradas normais, os diferentes tratamentos foram comparados pelo teste *de Tukey*. Todos os testes foram conduzidos com um nível de significância de 5%.

Foi empregado o pacote estatístico SPSS 20.0. (IBM Co.)

## **3 RESULTADOS**

O gráfico cartesiano de nuvens (Figura 2) mostra a dispersão das médias agrupadas da biomassa das três cepas vs a somatória das médias agrupadas da atividade proteolítica para cada tratamento e controle.





**Figura 2.** Distribuição espacial das médias de biomassa e de atividade proteolítica. Os diâmetros horizontais das elipses indicam os intervalos de confiança (IC95%) para as medidas de biomassa e os diâmetros verticais indicam os IC95% para atividade proteolítica. Na tabela, letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes.

Em termos de biomassa, foi observado que somente EE+DRSP na concentração farmacológica reduziu a formação de biofilme quando comparado ao controle sem qualquer esteroide ( $p = 0,023$ ). Por outro lado, o aumento da concentração promoveu incrementos significantes na virulência, em termos de proteólise ( $p < 0,01$ ). A atividade proteolítica revelou que os desafios com EE+DRSP elevam-se de forma concentração-dependente.

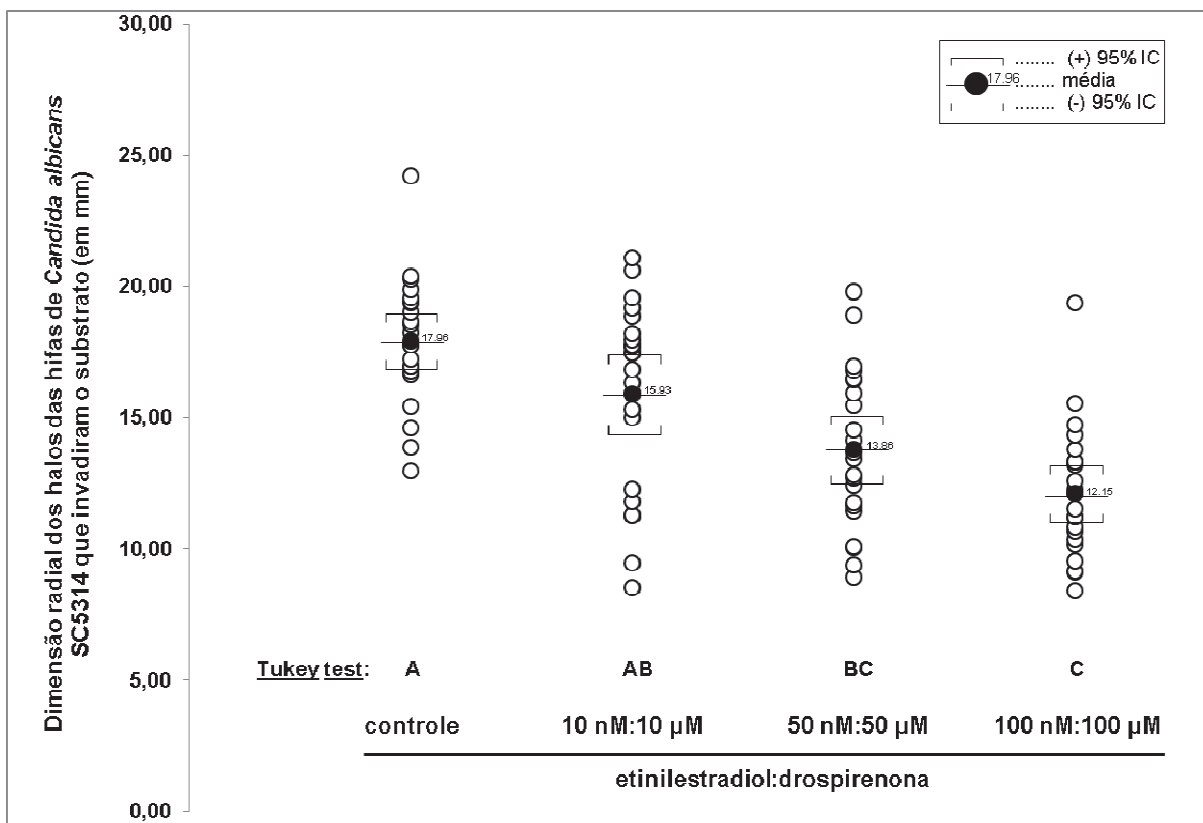
As porcentagens de células que apresentavam tubos germinativos sem exposição ao EE+DRSP foram 23% (ATCC<sup>®</sup>90028<sup>™</sup>), 25% (SC5314) e 39% (15A2). Com a exposição ao EE+DRSP, os valores foram 26% (ATCC<sup>®</sup>90028<sup>™</sup>), 24% (SC5314) e 37% (15A2), não havendo diferenças estatisticamente significantes entre a presença e a ausência do esteroide.

Em relação ao comprimento dos tubos germinativos, não foram detectadas alterações decorrentes da exposição aos xenobióticos, para nenhuma das cepas ( $p \geq 0,670$ ). Os tubos germinativos dos controles tiveram tamanhos médios de  $12,1 \pm 2,4 \mu\text{m}$  (ATCC<sup>®</sup>90028<sup>™</sup>),  $13,4 \pm 2,8 \mu\text{m}$  (SC5314) e  $11,0 \pm 1,9 \mu\text{m}$  (15A2). A exposição à EE+DRSP alterou os comprimentos para  $11,6 \pm 3,0 \mu\text{m}$  (ATCC<sup>®</sup>90028<sup>™</sup>),  $14,5 \pm 2,8 \mu\text{m}$  (SC5314) e  $12,9 \pm 3,2 \mu\text{m}$  (15A2).

As medidas radiais dos halos de invasão das hifas de *C. albicans* SC5314 variaram de 7,56 mm a 24,06 mm, nas diferentes concentrações de EE+DRSP. A combinação que continha EE+DRSP 10nM:10 $\mu$ M não divergiu do controle ( $p = 0,406$ ) (Figura 3). O grupo experimental contendo cinco vezes mais esteroides (EE+DRSP 50nM:50 $\mu$ M) mostrou menor potencial de invasibilidade, quando comparado com o controle ( $p = 0,012$ ). O incremento de dez vezes na concentração dos esteroides (EE+DRSP 100nM:100 $\mu$ M) promoveu uma redução acentuada na invasibilidade ( $p < 0,0001$ ), em relação ao controle. As concentrações 10nM:10 $\mu$ M e 50nM:50 $\mu$ M não apresentaram diferenças significativas entre si ( $p = 0,308$ ).

#### **4 DISCUSSÃO**

Embora existam alguns relatos de alterações fisiológicas envolvendo contraceptivos com implicação na virulência [16], de nosso conhecimento, este estudo é pioneiro no que se refere à formação de biofilme e na secreção de proteases fúngicas.



**Figura 3.** Comparações múltiplas das dimensões radiais dos halos de invasibilidade de hifas de *C. albicans* SC5314 na presença de EE+DRSP combinados em diferentes concentrações.

Este estudo pioneiro revelou que quando exposta ao EE+DRSP, células de *Candida albicans* não sofrem incrementos na biomassa dos biofilmes e, quando houve alteração, envolveu redução da biomassa. Ainda, a exposição ao contraceptivo não foi suficiente para causar qualquer incremento na indução de tubos germinativos. Tal fato, em princípio, foi considerado inesperado visto que outros grupos publicaram anteriormente que hormônios estrógenos femininos podem induzir aumentos no número de células com essas estruturas [11,9]. No entanto, a DRSP é um fármaco moderno [17], com o qual se busca uma melhor cobertura contraceptiva com minimização de efeitos indesejáveis [18]. Sua estrutura e atividade a tornam diferente dos outros contraceptivos anteriormente utilizados [19]. Diferentemente de outros contraceptivos, a DRSP apresenta uma expressiva ação antiandrogênica [20]. Dados preliminares de nosso laboratório mostram que fármacos androgênicos aumentam sobremaneira a formação de hifas derivadas de

tubos germinativos (dados não publicados). Foi demonstrado que a associação EE+DRSP não exerce qualquer efeito incrementador de virulência derivado da formação de estruturas micelianas.

Por outro lado, houve uma maior atividade proteolítica quando as células foram desafiadas com EE+DRSP e essa relação foi dose-dependente. Quando *C.albicans* é exposta a concentrações suprafarmacológicas de esteroides pode ocorrer expressão de genes de fatores de transcrição EFG1, CPH1 e TUP1 que regulam positivamente a transição dimórfica de levedura para a forma filamentosa [21]. Esses mesmos fatores co-induzem a transcrição de várias proteases [22]. Estudos posteriores deverão ser realizados para avaliar esses fatores de transcrição quando expostos ao EE+DRSP.

Tão importante quanto a elevação na atividade proteolítica total é a atividade proteolítica específica (APE), que mostra a extensão da ação dos xenobióticos nas células. Todos os desafios com EE+DRSP modularam positivamente a secreção de proteases. Digno de nota, a concentração 50 nM:50 µM incorreu em valores aumentados de APE. Essa maior secreção proporcional certamente confere um pior prognóstico em termos de destruição tecidual.

Os resultados obtidos mostraram que com a elevação nas concentrações dos esteroides da ordem de cinco e dez vezes, existe uma tendência em reduzir a capacidade de invasão por hifas de *C. albicans*. Optou-se por utilizar somente a SC5314 neste teste por se tratar de uma cepa amplamente empregada em estudos de virulência e de patogenicidade do fungo, sendo considerada como cepa-padrão para estudos dessa natureza [23,24,25].

Essa redução na invasibilidade foi totalmente inesperada, pois estudos anteriormente publicados aventaram para a possibilidade de aumento na taxa de

produção de hifas na presença de moléculas esteroides [11,9]. Contudo, quando analisados atentamente, algumas diferenças na condução experimental podem ser determinantes para tais discrepâncias. Primeiro, os estudos citados [11,9] avaliaram a formação de tubos germinativos (primeiro estágio da formação de hifas) em ambiente líquido ao passo que o nosso foi em substrato semi-sólido, o qual remete mais à realidade no que se refere a invasão tecidual. Segundo, ambos empregaram 17- $\beta$ -estradiol, uma molécula com características químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas distintas das aqui ensaiadas [26,27].

Em termos de virulência mediada por hifas, o impacto clínico dessa redução concentração-dependente na formação de hifas pode ser interessante, posto que foi observada uma redução significativa entre controle e EE+DRSP 50nM:50 $\mu$ M, próximos da concentração plasmática encontrada em mulheres sob terapia contraceptiva [26,28]. A associação dos esteroides nas concentrações próximas daquelas da distribuição nos tecidos pode interferir no metabolismo fúngico, de uma maneira ainda não definida, promovendo um retardamento na taxa de divisão celular miceliana.

## **5 CONCLUSÃO**

Quando exposta ao contraceptivo oral combinado EE+DRSP, *Candida albicans* não forma maiores quantidade de biofilme, tampouco gera mais tubos germinativos ou se torna mais invasiva. Porém, secreta maiores quantidades de proteases, que facilitam a adesão e invasão dos tecidos, conferindo maior agressividade ao fungo.

## REFERÊNCIAS

- [1] United Nations. Department of Economic and social affairs. Population Division 2011. World Contraceptive Use 2011. New York: United Nations.
- [2] Mosher WD, Jones J. (2010). Use of contraception in the United States: 1982–2008. National Center for Health Statistics. Vital Health Stat 23(29).
- [3] Singer N. A birth control pill that promised too much. *The New York Times*. 2009
- [4] Lader D. (2009). Opinions Survey Report N° 41. Contraception and Sexual Health, 2008/09. London: Office for National Statistics. 105p.
- [5] Hayashi A. (2009). Japanese Women Shun The Pill. CBS News. Acessível em: <http://www.cbsnews.com/stories/2004/08/20/health/main637523.shtml>
- [6] Ministério da Saúde. (2006). Pesquisa nacional de demografia e saúde da criança e mulher (PNDS). Atividade sexual e anticoncepção. Acessível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/pnds/atividade\\_sexual.php](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/pnds/atividade_sexual.php).
- [7] Ford LC, Hammill HA, DeLange RJ, Bruckner DA, Suzuki-Chavez F, Mickus KL, Lebherz TB. Determination of estrogen and androgen receptors in *Trichomonas vaginalis* and the effects of anti-hormones. *Am J Obstet Gynecol*. 1987; 156(5):1119-21.
- [8] Rowland SS, Falkler WA Jr, Bashirelahi N. Identification of an estrogen-binding protein in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1992; 42(7):721-7.
- [9] Cheng G, Yeater KM, Hoyer LL. Cellular and molecular biology of *Candida albicans* estrogen response. *Eukaryot Cell*. 2006; 5(1):180-91.
- [10] Chelikani V, Rawson FJ, Downard AJ, Gooneratne R, Kunze G, Pasco N, Baronian KH. Electrochemical detection of oestrogen binding protein interaction

- with oestrogen in *Candida albicans* cell lysate. *Biosens Bioelectron.* 2011; 26:3737-41.
- [11] White S, Larsen B.. *Candida albicans* morphogenesis is influenced by estrogen. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 1997; 53:744-9.
- [12] Thien ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. In vitro biofilm formation of 7 *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species under dynamic and 8 anaerobic conditions. *Arch Oral Biol.* 2007; 52(8):761-7.
- [13] Rosa EA, Rached RN, Ignácio SA, Rosa RT, José da Silva W, Yau JY, 10 \Samaranayake LP. Phenotypic evaluation of the effect of anaerobiosis on some 11 virulence attributes of *Candida albicans*. *J Med Microbiol.* 2008; 10:1277-81.
- [14] Selow ML, Rymovicz AU, Ribas CR, Saad RS, Rosa RT, Rosa EA. Growing *Candida albicans* Biofilms on Paper Support and Dynamic Conditions. *Mycopathologia* 2015; 180(1-2):27-33.
- [15] Carvalho AP, Gursky LC, Rosa RT, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs may modulate the protease activity of *Candida albicans*. *Microb Pathog.* 2010; 49(6): 315-22.
- [16] Güzel AB, Küçükgöz-Güleç U, Aydın M, Gümral R, Kalkanci A, Ilkit M. *Candida vaginitis* during contraceptive use: the influence of methods, antifungal susceptibility and virulence patterns. *J Obstet Gynaecol.* 2013; 33(8):850-6.
- [17] Fuhrmann U, Krattenmacher R, Slater EP, Fritzscheier KH. The novel progestin drospirenone and its natural counterpart progesterone: biochemical profile and antiandrogenic potential. *Contraception.* 1996; 54(4):243-51.
- [18] Schindler AE. The "newer" progestogens and postmenopausal hormone therapy (HRT). *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014;142:48-51.

- [19] Krattenmacher R. Drospirenone: pharmacology and pharmacokinetics of a unique progestogen. *Contraception*. 2000; 62(1):29-38.
- [20] Schindler AE. Antiandrogeni progestins for treatment of signs of androgenisation and hormonal contraception. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2004; 112(2):136-41.
- [21] Banerjee D, Martin N, Nandi S, Shukla S, Dominguez A, Mukhopadhyay G, Prasad R. A genome-wide steroid response study of the major human fungal pathogen *Candida albicans*. *Mycopathologia*. 2007;164:1–17.
- [22] Naglik JR, Challacombe SJ, Bernhard Hube B. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. *Microb Molec Biol Rev*. 2003; 67(3):400–428
- [23] Taniguchi L, Faria BF, Rosa RT, Paula e Carvalho A, Gursky LC, Elifio-Esposito SL, Parahitiyawa N, Samaranayake LP, Rosa EA. Proposal of a low-cost protocol for colorimetric semi-quantification of secretory phospholipase by *Candida albicans* grown in planktonic and biofilm phases. *J Microbiol Methods*. 2009; 78(2):171-4
- [24] Ronsani MM, Mores Rymovicz AU, Meira TM, et al. Virulence modulation of *Candida albicans* biofilms by metal ions commonly released from orthodontic devices. *Microb Pathog*. 2011; 51: 421.
- [25] Lüttich A, Brunke S, Hube B, Jacobsen ID. Serial passaging of *Candida albicans* in systemic murine infection suggests that the wild type strain SC5314 is well adapted to the murine kidney. *PLoS One*. 2013; 30;8(5):e64482
- [26] Krattenmacher R. Drospirenone: pharmacology and pharmacokinetics of a unique progestogen. *Contraception*. 2000; 62(1):29-38.



- [27] Stanczyk FZ, Hapgood JP, Winer S, Mishell DR Jr. Progestogens Used in Postmenopausal Hormone Therapy: Differences in Their Pharmacological Properties, Intracellular Actions, and Clinical Effects. *Endocr Rev.* 2013; 34(2): 171–208.
- [28] Brenner PF, Goebelsmann U, Stanczyk FZ, Mishell DR Jr. Serum levels of ethinylestradiol following its ingestion alone or in oral contraceptive formulations. *Contraception.* 1980; 22(1):85-95.

7 FÍGURAS

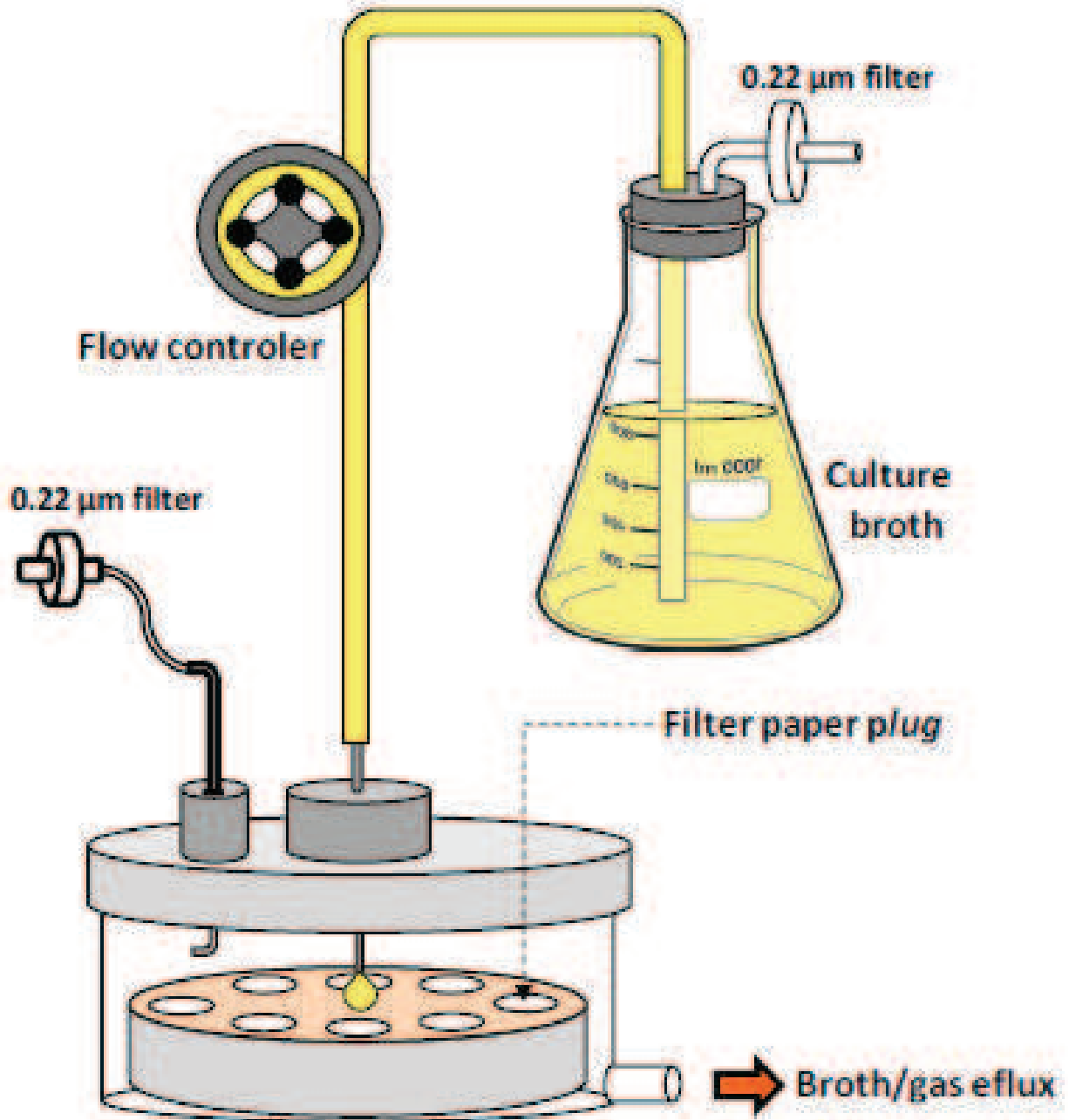
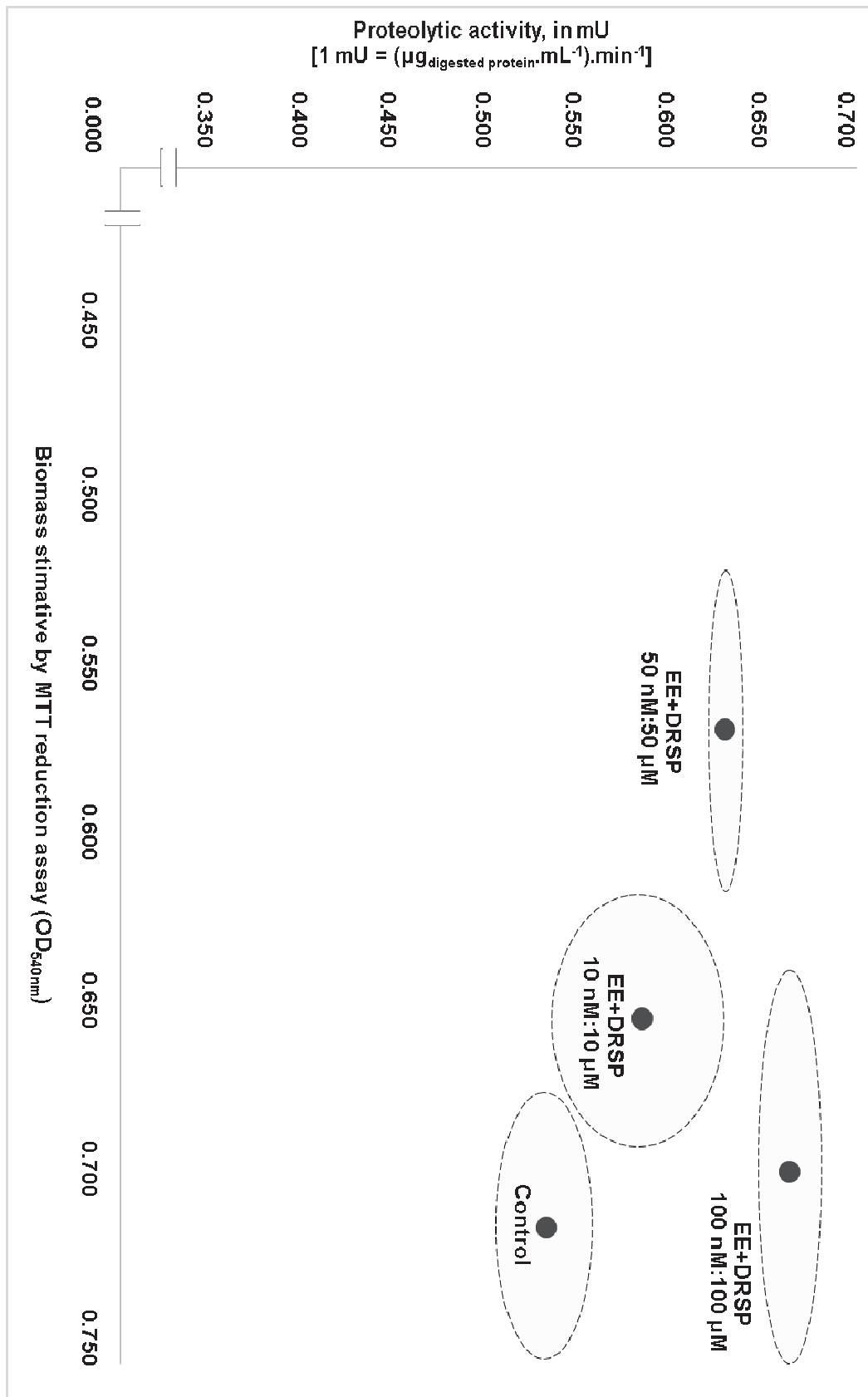


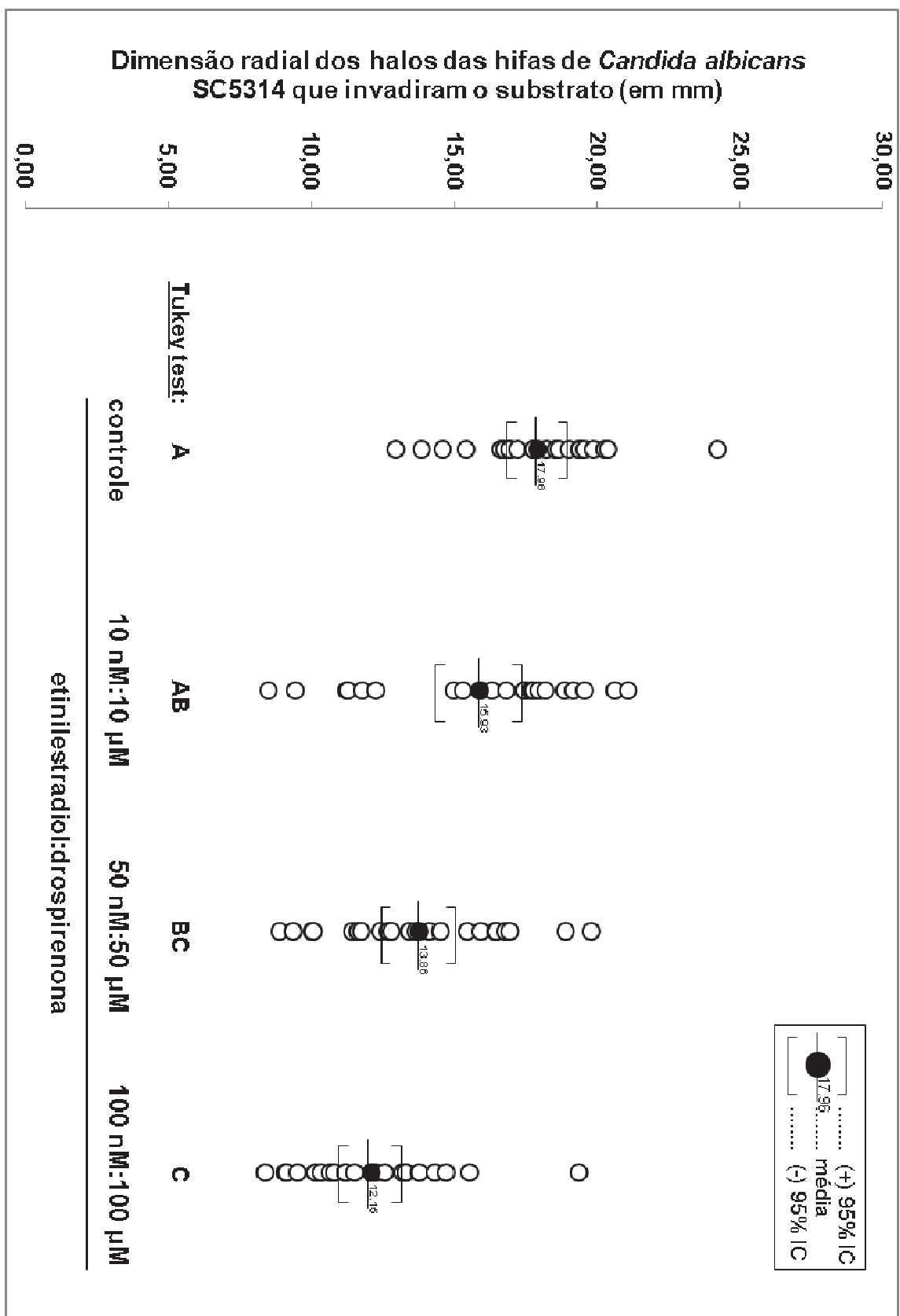
Figura 1. Biorreactor para Biofilmes sobre Papel (PEBR)



**Figura 2.** Distribuição espacial das médias de biomassa e de atividade proteolítica. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes.

<b>Average values of biomasses, proteolytic activity (PA) and specific proteolytic activity (SPA)</b>				
<b>proteolytic activity (SPA)</b>				
<b>Biomass</b>				
<b>MTT reduction (OD<sub>540nm</sub>)</b>	control	10 nM:100 µM	50 nM:50 µM	100 nM:100 µM
	0.710 <sup>A</sup>	0.650 <sup>A</sup>	0.564 <sup>B</sup>	0.694 <sup>A</sup>
95% IC	0.641-0.779	0.570-0.730	0.475-0.653	0.329-1.062
<b>Proteolytic activity (PA)</b>				
[(mg.mL <sup>-1</sup> ).min <sup>-1</sup> ].1000	control	10 nM:100 µM	50 nM:50 µM	100 nM:100 µM
	0.532 <sup>A</sup>	0.584 <sup>AB</sup>	0.629 <sup>B</sup>	0.664 <sup>C</sup>
95% IC	0.503-0.561	0.544-0.624	0.515-0.743	0.453-0.875
<b>Specific proteolytic activity (SPA)</b>				
PA.biomass <sup>-1</sup>	control	10 nM:100 µM	50 nM:50 µM	100 nM:100 µM
	0.749 <sup>A</sup>	0.899 <sup>AB</sup>	1.114 <sup>C</sup>	0.957 <sup>B</sup>

**Figura 2.1** Média dos valores das biomassas, atividade proteolítica (AP) e atividade proteolítica específica (APE)



**Figura 3.** Comparações múltiplas das dimensões radiais dos halos de invasibilidade de hifas de *C. albicans* SC5314 na presença de EE+DRSP combinados em diferentes concentrações.