

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

VANESSA MARQUES BARRETO PONTES

MODELO BIOLÓGICO APLICADO EM LEVEDURAS
QUANTO À HABILIDADE DE ADERÊNCIA E FORMAÇÃO
DE BIOFILME NA SUPERFÍCIE DE CONES VAGINAIS

Recife
2018

VANESSA MARQUES BARRETO PONTES

**MODELO BIOLÓGICO APLICADO EM LEVEDURAS
QUANTO À HABILIDADE DE ADERÊNCIA E FORMAÇÃO
DE BIOFILME NA SUPERFÍCIE DE CONES VAGINAIS**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Patologia do Centro de Ciências da
Saúde da Universidade Federal de
Pernambuco, como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Mestre em Patologia.

Orientador

Prof^a Dra. Rejane Pereira Neves

Área de Concentração

Patologia

Linha de Pesquisa

Aspectos biotecnológicos e microbiológicos aplicado à patologia.

**Recife
2018**

Catálogo na fonte:
Bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

P813m Pontes, Vanessa Marques Barreto.
Modelo biológico aplicado em leveduras quanto à habilidade de aderência e formação de biofilme na superfície de cones vaginais / Vanessa Marques Barreto Pontes. – Recife: o autor, 2018.
68 f.; il.; 30 cm.

Orientadora: Rejane Pereira Neves.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Patologia.
Inclui referências e anexos.

1. Incontinência urinária. 2. Candida albicans. 3. Biofilmes. 4. Cones vaginais. 5. Infecções Urinárias. I. Neves, Rejane Pereira (orientadora). II. Título.

616.07 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2018 - 162)



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Centro de Ciências da Saúde - UFPE

Av. Prof. Moraes Rego 1235 - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife – PE

Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - térreo

Fone/Fax: (81) 2126.8529

<http://www.ppgpatologiaufpe.com>

DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM PATOLOGIA

AUTOR: VANESSA MARQUES BARRETO PONTES

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA

NOME DA DISSERTAÇÃO: “MODELO BIOLÓGICO APLICADO EM LEVEDURAS QUANTO À HABILIDADE DE ADERÊNCIA E FORMAÇÃO DE BIOFILME NA SUPERFÍCIE DE CONES VAGINAIS”

ORIENTADOR: PROF^A DRA. REJANE PEREIRA NEVES

DATA DA DEFESA: 01 DE MARÇO DE 2018.

DATA DE APROVAÇÃO: 01 DE MARÇO DE 2018

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto.
Dept^o de Medicina Tropical – CCS/UFPE

Prof^a. Dr^a. Henrique John Pereira Neves
Dept^o de Biologia de Fungos – CCS/UFPE

Prof. Dr. Oliane Maria Correia Magalhães.
Dept^o de Biologia de Fungos– CCB/UFPE

AGRADECIMENTOS

A Deus,

Pela oportunidade, inspiração, força, bênçãos e proteção.

À Família,

Aos meus pais, Luiz Antônio Barreto Pontes e Magali Marques Barreto Pontes, que me incentivaram a buscar uma melhor formação, pelo apoio carinhoso, pelos conselhos diários, pelo amor incondicional, orações e paciência nos momentos de ausência.

Ao meu irmão, Thiago Marques Barreto Pontes, pelo seu carinho e apoio, que apesar da distância física, sempre se faz presente.

Agradeço especialmente à minha avó Risete Correia da Silva, por sempre acreditar na minha capacidade de crescimento, pelo exemplo de mulher guerreira que é, e sempre será, em minha vida.

Agradeço aos meus avós, Maria Rita Barreto Pontes, Luiz Pontes e Ivaldo Marques da Silva, que agora são anjos que espalham brilho no céu, pelo privilégio de viver ao lado deles, pelas lições mais valiosas dadas e pelo exemplo de experiência, trabalho, honestidade, fé e principalmente amor.

Aos meus tios e tias, que sempre acompanharam de perto todas as minhas conquistas, em especial Tia Marise, Marcia, Magda, Eliane e Gracinha.

Aos Amigos,

Aos meus amigos, em especial Daniela Chá, Marcela Araújo, Filipe Peixe, Evellyne Figueiroa, Vanessa Cordeiro, Patrícia Rodrigues e Anna Samonne que estiveram comigo em todos os momentos de alegria e tristeza e por me ajudarem a ser alguém melhor.

Ao meu namorado, Walter Maia, por ser meu companheiro em todos os momentos, pela paciência e dedicação, por estar ao meu lado nos momentos de angústia e por me incentivar e acreditar nos meus objetivos e perspectivas futuras.

À minha orientadora, Dra. Rejane Pereira Neves, pelos ensinamentos, incentivo, confiança e por seu exemplo como profissional.

À Universidade Federal de Pernambuco pela oportunidade: aos docentes e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Patologia, pois sei que minha formação não seria completa sem vocês.

Aos amigos do mestrado, em especial Patrícia Rodrigues, Mayara Moura e Arthur Hipólito, pelo carinho, amizade, amor e momentos vividos durante esses dois anos.

Aos colegas da pós-graduação e dos laboratórios de Imunodiagnóstico de Infecções Fúngicas e de Micologia Médica, em especial aos amigos Franz de Assis, Daniela Buonafina, Melyna Chaves, Ana Emília e Cícero, pelo tempo dedicado em me orientar, ensinar e ajudar nos experimentos.

Aos que não foram mencionados, mas que contribuíram direta e indiretamente nessa conquista e que cruzaram o meu caminho nos últimos dois anos, meu Muito Obrigada!

*“Em tudo dai graças; porque esta é a vontade de
Deus em Cristo Jesus para convosco”
(1 Tessalonicenses 5:18)*

RESUMO

A incontinência urinária é caracterizada pela perda involuntária de urina e representa um problema social e higiênico que interfere na vida social e profissional dos acometidos. Quando associada a infecção do trato urinário, pode conduzir a uma piora clínica do quadro, aumentando os episódios de perda e predispondo os indivíduos a infecções sistêmicas. As leveduras do gênero *Candida* fazem parte da microbiota normal da mucosa vaginal e um dos seus principais fatores de virulência são a capacidade de aderir e formar biofilmes. O biofilme é caracterizado por agregados de microrganismos que podem aderir entre si e formar estruturas mais complexas em tecidos vivos ou superfícies de biomateriais promovendo o desenvolvimento de infecção. A formação de biofilme em alguns dispositivos como os cones vaginais utilizados no tratamento de mulheres incontinentes, ainda não foi analisado. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a capacidade formação de biofilme por *Candida albicans* sobre a superfície dos cones vaginais. As 7 cepas de *Candida albicans* de secreção vaginal, selecionadas da Coleção de Cultura URM, foram avaliadas quanto a habilidade de formação de biofilme. As suspensões dos isolados foram padronizadas e os testes realizados em microplacas de fundo chato com 96 poços, incubadas a 37°C, por 24 e 48 horas. Os biofilmes de *Candida albicans* foram produzidos sobre segmentos de cones vaginais e introduzidos em poços de placas de microtitulação, sendo incubados a 37°C em contato com as suspensões de leveduras durante 24 e 48 horas. A atividade metabólica das células no biofilme formado sobre os cones foi analisada pelo método MTT. Na avaliação do biofilme formado em 24 horas, 5 isolados apresentaram atividade fraca e um isolado atividade forte. Após 48 horas, 4 revelaram atividade moderada no biofilme formado. O biofilme formado por *C. albicans* 743, produziu o maior valor de absorvância sendo estatisticamente maior quando comparados com as demais espécies. Quanto a atividade metabólica as células de *C. albicans* 4990, *C. albicans* 5900 e *C. albicans* 743 aderidas ao cone, após 24h, apresentaram atividade de 1.74 ± 0.39 , 2.06 ± 0.41 e 0.43 ± 0.02 , respectivamente. *C. albicans* 4987, *C. albicans* 6974, *C. albicans* 743 e a cepa de referência ATCC 90028 após 48h de incubação apresentaram atividade de 1.50 ± 0.35 , 1.52 ± 0.46 , 0.54 ± 0.47 e 1.45 ± 0.15 , respectivamente. O biofilme de *Candida albicans* 5900, cultivado nos segmentos dos cones de diferentes cores, foi o que apresentou maior atividade nos cones amarelo, vermelho e branco, nas primeiras 24h.

Palavras-chave: Incontinência urinária. *Candida albicans*. Biofilmes. Cones vaginais. Infecções Urinárias.

ABSTRACT

Urinary Incontinence is characterized by the involuntary loss of urine and represents a social and hygienic concern interfering in the social and professional life of patients. When the infection of the urinary tract is associated, it can lead to a clinical exacerbation of the disease, besides increased episodes of loss and predisposition of individuals and infections. *Candida* yeasts are part of the normal microbiota of the vaginal mucosa and one of the main virulence factors is the ability to adhere and form biofilms. Biofilm is characterized by aggregates of microorganisms that can adhere to each other and form more complex structures in living tissues or biomaterial surfaces promoting the development of infection. The formation of biofilms in some devices such as vaginal cones used for the treatment of women that present incontinency has not been analyzed yet. The objective of this research was evaluating the capacity of biofilm formation by *Candida albicans* on the surface of vaginal cones. The 7 strains of *Candida albicans* of vaginal secretion, selected from the URM Culture Collection, were evaluated for the ability of biofilm formation. Isolate suspensions were standardized and assays were performed in 96 well flat bottom microplates that were incubated at 37 ° C for 24 and 48 hours. *Candida albicans* biofilms were produced on segments of vaginal cones, introduced into wells of microtiter plates and incubated at 37 ° C in contact with the yeast suspensions for 24 and 48 hours. The metabolic activity of the non-biofilm cells formed on the cones was analyzed by the MTT method. In the evaluation of biofilm formed in 24 hours, 5 isolates presented weak activity and one isolated strong activity. After 48 hours, 4 revealed moderate activity in the formed biofilm. The biofilm formed by *C. albicans* 743, showed the highest absorbance value, which was statistically higher in comparison to other species. As for the metabolic activity, the cells of *C. albicans* 4990, *C. albicans* 5900 and *C. albicans* 743 adhered to the cone after 24h presented activity of 1.74 ± 0.39 , 2.06 ± 0.41 and 0.43 ± 0.02 , respectively. *C. albicans* 4987, *C. albicans* 6974, *C. albicans* 743 and the reference strain ATCC 90028 after 48 h of incubation presented activity of 1.50 ± 0.35 , 1.52 ± 0.46 , 0.54 ± 0.47 and 1.45 ± 0.15 respectively. The biofilm of *Candida albicans* 5900, cultivated in the segments of the cones of different colors, showed the highest activity in the yellow, red and white cones for the first 24 hours.

Key-words: Urinary Incontinence. *Candida albicans*. Biofilms. Vaginal Cones. Urinary Infections.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Materiais e Métodos

	Página
Figura 1- Cones vaginais de pesos variados marca FemCom- Quark Medical. (Fonte: arquivo pessoal)	33
Figura 2- Fragmentos de cones vaginais após processo de esterilização em autoclave. (Fonte: arquivo pessoal)	36
Figura 3- Placas de cultura com Ágar Sabouraud Dextrose contendo água destilada (a) e fragmentos dos cones vaginais (b) após procedimento de esterilização em autoclave e incubação. (Fonte: arquivo pessoal)	36

Artigo Original

Figura 1- Avaliação qualitativa da capacidade de formação de biofilmes de 48 horas por <i>C. albicans</i> . (Fonte: arquivo pessoal)	43
Figura 2- Boxplot dos valores médios de absorvância das soluções do Cristal Violeta (Abs CV) obtidos após 24 e 48 horas em biofilme formado pelos isolados de <i>Candida albicans</i> de origem vaginal. (Fonte: arquivo pessoal)	44
Figura 3- Boxplot da atividade metabólica (valores médios de absorbância) de células viáveis do biofilme formado pelos isolados de <i>Candida albicans</i> na superfície dos cones vaginais durante 24 e 48 horas obtidos através do método de redução de sal MTT. (Fonte: arquivo pessoal)	46
Figura 4- Resultados da absorbância (células viáveis) obtidos por espectrofotometria a 570 nm após 24h e 48h de formação de biofilme por <i>C. abicans</i> 743, <i>C. albicans</i> 4986, <i>C. albicans</i> 5900 na superfície dos cones vaginais pelo método MTT. Os níveis de absorvância correlacionam-se com o tempo de maturação dos isolados testados em horas e as cores do cone. (Fonte: arquivo pessoal)	47

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Materiais e Métodos

	Página
Tabela 1- Linhagens obtidas da coleção de de culturas micoteca URM utilizadas no estudo.	34

Artigo Original

Tabela 1- Avaliação qualitativa da capacidade de formação de Biofilme dos isolados testados após aplicação do corante Fucsina a partir de 24h de incubação.	42
Tabela 2- Avaliação qualitativa da capacidade de formação de Biofilme dos isolados testados após aplicação do corante Fucsina a partir de 48h de incubação.	43
Tabela 3- Comparação entre as médias de aderência e formação dos biofilmes formados por isolados de <i>Candida albicans</i> pelo teste de TUKEY.	45
Tabela 4- Comparação entre as médias de aderência e formação dos biofilmes formados por isolados de <i>Candida albicans</i> pelo teste de TUKEY.	45
Tabela 5- Valores de absorbância obtidos do biofilme dos isolados de <i>C. albicans</i> formado sobre a superfície do cone vaginal, incubadas a uma temperatura de 37° C para 24h e 48h, conforme determinado no teste MTT. Os dados são expressos através de médias e os respectivos desvios padrões (Média ± DP).	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABS	Acrilonitrila Butadieno Estireno
ALS	<i>Agglutinin-Like Sequence</i>
ANOVA	Análise de Variância
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Candida spp.</i>	Espécies de <i>Candida</i>
CV	Cristal Violeta
HEPES	Ácido 4-(2- HidroxiEtil)-1-PiperazinEtanolSulfônico, do inglês (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
ICS	Sociedade Internacional de Continência, do inglês <i>International Continence Society</i>
ITU	Infecção do trato urinário
IU	Incontinência Urinária
IUE	Incontinência Urinária de Esforço
IUM	Incontinência Urinária Mista
IUU	Incontinência Urinária de Urgência
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazólio
PBS	Tampão Fosfato Salino, do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
teste-T	Teste <i>t</i> student
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
URM	Universidade Recife Micologia
XTT	Sal de tetrazólio

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	Incontinência Urinária em Mulheres	17
2.2	Cones Vaginais no Tratamento da Incontinência Urinária Feminina	20
2.3	Microbiota Fúngica Vaginal	23
2.4	<i>Candida albicans</i> e Infecções Geniturinárias	24
2.5	Biofilmes por <i>Candida albicans</i>	26
2.6	Métodos de estudo de biofilme de leveduras	29
3	OBJETIVOS	32
3.1	Geral	32
3.2	Específicos	32
4	METODOLOGIA	33
4.1	Tipo e Local de Estudo	33
4.2	Cones Vaginais	33
4.3	Leveduras	34
4.4	Preparo e padronização das suspensões de <i>Candida</i>	35
4.5	Preparação dos segmentos dos cones vaginais	35
4.6	Avaliação da produção de biofilme	36
4.7	Avaliação da capacidade de formação de biofilme na superfície dos cones vaginais	37
4.8	Análise estatística	39
5	RESULTADOS - ARTIGO ORIGINAL	40
	INTRODUÇÃO	40
	RESULTADOS	42
	DISCUSSÃO	48
	MATERIAIS E MÉTODOS	50
	REFERÊNCIAS	53
6	CONCLUSÕES	57
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
	REFERÊNCIAS	60
	ANEXO A- ARTIGO DE REVISÃO	68

1 APRESENTAÇÃO

De acordo com a Sociedade Internacional de Continência (ICS), a Incontinência Urinária (IU) é definida como perda involuntária de urina, considerada um problema social ou até mesmo higiênico (ABRAMS et al., 2003). Em 2008, cerca de 348 milhões de pessoas (8,2%) em todo o mundo apresentavam IU e estima-se que essa prevalência aumentará para mais que 8,5% até 2018 (IRWIN et al., 2011).

No Brasil, os estudos mostram que a prevalência dessa condição clínica é predominante na população feminina, embora seja variada de acordo com algumas características populacionais (JUSTINA, 2013). Vários fatores podem contribuir para a incidência, progressão ou remissão da IU, incluindo a estrutura anatômica, hereditariedade, multiparidade, tipo de parto, trauma pélvico, tosse crônica, constipação e a infecção do trato urinário (SUMARDI et al., 2014). As infecções do trato urinário (ITU) são comuns em mulheres com distúrbios do assoalho pélvico, incluindo mulheres com incontinência urinária de urgência (IUU) ou aquelas submetidas a algum tipo de instrumentação do trato urinário (BRUBAKER ET AL., 2014; SUBRAMANIAM, 2016). A relação entre a infecção e a gravidade da incontinência urinária feminina ainda não foi completamente esclarecida, porém foi demonstrado que a perda de urina ocorre com maior pressão da bexiga em pacientes com história de ITU. Ademais, comunidades bacterianas, virais e, principalmente, fúngicas podem estar associadas a sintomas pré-tratamento da IUU (BRUBAKER; WOLFE, 2015; HEYDARI et al., 2016). A ICS reconheceu em 2013, a associação entre indivíduos com incontinência urinária e ocorrência de ITU conduzindo a um curso clínico desfavorável, então, vem incentivando a realização de estudos que avaliem essa relação da IU e o desenvolvimento da ITU, mas também outros fatores que possam estar associados (MELO et al., 2017).

A microbiota vaginal representa um dos mais importantes mecanismos de defesa contra a proliferação de microrganismos, mas alguns fatores exógenos e endógenos podem provocar flutuações na colonização vaginal criando condições adequadas para o desenvolvimento exacerbado, formação de biofilmes e, assim, o estabelecimento da doença (LINHARES et al., 2010).

Biofilmes são formados por agregados de microrganismos que se aderem entre si e formam estruturas complexas em células vivas e superfícies inertes (JABRA-RIZK; FALKLER; MEILLER, 2004; BLANKENSHIP; MITCHELL, 2006; SILVA et al., 2009). Estudos têm demonstrado que uma variedade de bactérias e fungos apresenta a capacidade de formar biofilmes na superfície de diversos dispositivos médicos (AULER et al., 2010; HARRIOTT et al., 2010; CUÉLLAR-CRUZ et al., 2012; KOCH; BÜRGERS; HAHNEL, 2013; SARDI et al., 2014) e que estes materiais proporcionam um ambiente ideal para a formação destas estruturas microbianas, cursando com a doença (STICKLER et al., 1998; GASPARETTO et al., 2005; BLANKENSHIP; MITCHELL, 2006; ARIANI et al., 2012; SARDI et al., 2014). Contudo, a formação de biofilme em alguns dispositivos ainda não foi avaliada, a exemplo dos cones vaginais utilizados no tratamento de incontinência urinária em mulheres e a sua repercussão.

Os cones vaginais são dispositivos cônicos, de mesma forma e volume, com peso variado e representam uma forma prática de identificar e fortalecer a musculatura do assoalho pélvico em mulheres incontinentes (PEATTIE; PLEVNIK; STANTON, 1988; BO, 1995; SANTOS et al., 2009; HADDAD et al., 2011; OBLASSER; CHRISTIE; MCCOURT, 2015). Ao ser inserido na vagina, o cone promove um biofeedback sensório-motor, que estimula os músculos do assoalho pélvico, que o circundam, a se contraírem. As contrações reflexas ou voluntárias dos músculos para prevenir o deslizamento do cone para fora, podem maximizar o ganho de força muscular e, conseqüentemente, reduzir a perda de urina. Então, é uma

importante e indispensável forma de tratamento na IU (SEO; YOON; KIM, 2004; MATHEUS et al., 2006; SANTOS et al., 2009; SILVA; OLIVA, 2011; GREER; SMITH; ARYA, 2012; OBLASSER; CHRISTIE; MCCOURT, 2015).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Incontinência Urinária em Mulheres

A incontinência urinária representa qualquer queixa de perda involuntária de urina. É considerada um importante problema de saúde pública mundial, que afeta inúmeras mulheres, gerando efeitos na qualidade de vida e um impacto socioeconômico grave devido aos custos financeiros necessários ao tratamento (ABRAMS et al., 2003; SUBAK et al., 2006).

Clinicamente, a incontinência urinária na mulher é dividida em três tipos principais: incontinência urinária de esforço (IUE), incontinência urinária de urgência (IUU) e incontinência urinária mista (IUM) (GHADERI; OSKOU EI, 2014; MACLACHLAN; ROVNER, 2015). Na IUE ocorre perda de urina aos esforços, por exemplo, ao tossir, espirrar, pular, deambular, mudar de decúbito e rir, estando relacionada com a diminuição da força de fechamento uretral, pela fraqueza esfinteriana, diante de aumentos transitórios da pressão intra-abdominal (BERQUÓ; RIBEIRO; AMARAL, 2009; COSTA; SANTO, 2012; MACLACHLAN; ROVNER, 2015). A IUU é mais frequentemente relacionada à hiperatividade do detrusor e caracteriza-se pela perda de urina acompanhada e/ou imediatamente precedida de urgência (BERQUÓ; RIBEIRO; AMARAL, 2009; MACLACHLAN; ROVNER, 2015). Pode ser classificada em dois subtipos, a sensorial que ocorre por uma irritação local ou a neurológica, ocasionada pela perda da inibição cerebral das contrações do detrusor. A IUM representa a combinação dos sintomas da IUE associada à urgência (BERQUÓ; RIBEIRO; AMARAL, 2009; KHANDELWAL; KISTLER, 2013; MACLACHLAN; ROVNER, 2015).

Pesquisas epidemiológicas têm demonstrado uma maior prevalência da incontinência urinária em mulheres sendo variável conforme a idade. No Brasil, na cidade de Pouso Alegre, no Estado de Minas Gerais, verificou-se, em uma amostra de 519 pessoas, uma prevalência da IU de 32,9% entre as mulheres e 6,2% entre os homens (SANTOS; SANTOS, 2010). No

município de São Paulo, um estudo registrou uma prevalência de IU de 26,2% em mulheres idosas, acima de 60 anos. Na cidade de Botucatu, a prevalência de IU foi observada em 27% das mulheres com idade superior a 20 anos, mostrando que a IU se eleva proporcionalmente de acordo com a idade (AMARO et. al, 2009; TAMANINI et. al, 2009).

Com relação aos tipos de incontinência, a IUE é a forma mais comum de queixa urinária entre as mulheres (51%), seguida de IUM (39%) e IUU (cerca de 10%). Quando analisada através da avaliação funcional pelo estudo urodinâmico, observa-se um aumento da prevalência da IUE em 51-77%, redução da IUM entre 11-39% e manutenção dos valores para a IUU (MOTA, 2017).

A fisiopatologia da IU é multifatorial, porém alguns fatores de risco associados aos sintomas geniturinários já foram descritos. Idade avançada, multiparidade, parto normal, cirurgias prévias, hipoestrogenismo, constipação, alto índice de massa corporal e infecções do trato urinário podem contribuir para alterações da função vesical e perda da função esfinteriana (RODHE et. al, 2008; AMARO et. al, 2009; OLIVEIRA et. al, 2010; CARVALHO et. al, 2014; PIZZOFERRATO et. al, 2015; NOJAVAN et. al, 2015; CELIKER TOSUN et al., 2016).

Os idosos com ITU têm chance 6,2 vezes maior de IU dos que aqueles idosos sem ITU. Entre as mulheres idosas que vivem na comunidade, as infecções do trato urinário estão associadas as perdas de urina frequentes, principalmente nos casos de incontinência urinária de urgência. As chances de bacteriúria aumentam com a frequência da incontinência. Vazamentos frequentes podem facilitar e estimular a subida bacteriana (RODHE et. al, 2008; SILVA; D'ELBOUX, 2012). As causas dessa associação, bem como suas implicações clínicas, não são claras (COYNE et al., 2013; BRUBAKER et al., 2014; SUBRAMANIAM, 2016).

A medida que a ITU piora o comportamento da bexiga, já instável, causa sintomas vesicais irritativos, urgência e frequência. Os possíveis mecanismos que explicam a ligação entre ITU e IU são as alterações de imunidade, enfraquecimento do assoalho pélvico, redução da capacidade vesical, alterações de mobilidade, alterações tróficas do epitélio pela queda dos níveis hormonais e a atrofia das mucosas, vaginal e uretral, que favorece a colonização por organismos patogênicos (LOUREIRO et al., 2011; SILVA; D'ELBOUX, 2012).

As consequências da incontinência urinária dependem da frequência, quantidade de perda de urina e da experiência subjetiva aos sintomas. A incontinência urinária afeta negativamente a vida física, sexual e as interações sociais da mulher devido à insegurança sobre sua própria higiene, constrangimento, estresse, frustração, perda de dignidade, sentimentos depressivos e limitações nas atividades profissionais por causa do odor ou medo de perder urina. Mulheres com sintomas de incontinência urinária mista, com perda moderada a grave, apresentam um maior impacto da qualidade de vida, principalmente no domínio emocional (BARENTSEN et al., 2012; NYSTROM et al., 2015). Além disso, a incontinência urinária é associada a altos custos de cuidados de rotina. A proporção de mulheres com custos semanais relacionados a incontinência é diretamente proporcional a frequência e severidade da perda. Uma estimativa dos custos anuais de mulheres com incontinência severa é de US\$ 900 sendo atribuídos a compra de fraldas, absorventes e gastos com lavadeira (SUBAK et al., 2006).

O tratamento da incontinência urinária pode ser cirúrgico, medicamentoso ou conservador e depende do tipo e das causas que levam as perdas de urina. Como a disfunção muscular representa um importante fator etiopatogênico da IU, a terapêutica conservadora, com o uso da reeducação perineal, deve buscar o fortalecimento dos componentes esfinterianos, melhora da transmissão das pressões intra-abdominais, aumento do tônus

muscular e, conseqüentemente, do mecanismo de continência (BERQUÓ; RIBEIRO; AMARAL, 2009; COSTA; SANTO, 2012).

Os métodos fisioterapêuticos são baseados nos princípios de que os movimentos voluntários repetidos podem proporcionar o aumento do tônus e da força muscular e permitir a conscientização através de sinais sensitivos (GHADERI; OSKOUEI, 2014). Desse modo, o treinamento muscular através da eletroestimulação perineal, exercícios de Kegel e os cones vaginais podem induzir a contração dos músculos do assoalho pélvico até o restabelecimento do comando contrátil, ganho de força e diminuição da incontinência (WILLIAMS et al., 2006; MACLACHLAN; ROVNER, 2015; SINGH et al., 2015).

2.2 Cones vaginais no tratamento da incontinência urinaria feminina

Os cones vaginais são dispositivos cônicos, de mesma forma e volume, com peso variando de 20 a 100 gramas, que determina para o conjunto de cones um número variável de um a nove. (PEATIE; PLEVNIK; STANTON, 1988; BO, 1995) O cone é confeccionado em resina de ABS (ACRILONITRILA, BUTADIENO, ESTIRENO), um termoplástico de boa resistência ao impacto, com cores diferentes de acordo com um peso específico (Rosa: 20 g; Amarelo: 32 g; Branco ou Bege: 45 g; Verde ou Lilás: 57 g; Azul ou vermelho: 70 g).

Foram propostos por Plevnik, em 1985, com o objetivo de aumentar a resposta sensorial e facilitar o aprendizado da contração da musculatura do assoalho pélvico, por meio da retenção de forma progressiva dos cones, em mulheres incontinentes (BELO et al., 2005; SANTOS et al., 2009; HADDAD et al., 2011; SILVA; OLIVA, 2011; GREER; SMITH; ARYA, 2012; OBLASSER; CHRISTIE; MCCOURT, 2015).

O dispositivo é inserido no canal vaginal, promovendo um biofeedback sensorial e motor, que induz a contração reflexa ou voluntária dos músculos do assoalho pélvico para impedir o deslizamento do cone para fora e mantê-lo em sua posição original. Essas

contrações promovem o aumento do tônus muscular e, conseqüentemente, reduzem a perda de urina (SEO; YOON; KIM, 2004; MATHEUS et al., 2006; SANTOS et al., 2009; SILVA; OLIVA, 2011; GREER; SMITH; ARYA, 2012; OBLASSER; CHRISTIE; MCCOURT, 2015).

De acordo com as diretrizes da sociedade Brasileira de urologia de 2006, os cones vaginais é um recurso importante na melhora da incontinência urinária, particularmente a de esforço, por estimular as fibras musculares tipo I e II, apresentando índices de sucesso que variam de 14 a 80% dos casos (PEATTIE; PLEVNIK; STANTON, 1988; CASTRO; OLIVEIRA, 2008; SANTOS et al., 2009; OBLASSER; CHRISTIE; MCCOURT, 2015).

Os cones vaginais podem ser utilizados sem exame vaginal sendo necessário apenas uma consulta para realização das orientações de sua utilização e etapas de fortalecimento da musculatura do assoalho pélvico em domicílio (HERBISON; PLEVNIK; MANTLE, 2002). Muitos autores preconizam o uso de cones vaginais apenas na fase passiva (PEATTIE; PLEVNIK; STANTON, 1988; PLEVNIK, 1985; BELO; FRANCISCO; CATARINO, 2005). Porém, quando associados aos exercícios do assoalho pélvico de forma ativa, também são seguros e eficazes (HADDAD, 2011). Na fase passiva é utilizado o cone mais pesado que a paciente consegue manter na vagina e representa a musculatura do assoalho pélvico em repouso com maior recrutamento das fibras musculares de contração lenta. A sensação de descida do cone promove uma contração muscular reflexa, involuntária. Na fase ativa, o seu uso é associado com a contração da musculatura do assoalho pélvico de forma voluntária (PEATTIE; PLEVNIK; STANTON, 1988).

Haddad et al. (2011), utilizou os cones em 21 mulheres com incontinência urinária de esforço, nas fases passiva e ativa, para que houvesse o recrutamento distinto das fibras musculares tipo I e II. Após o tratamento, 90,4% das pacientes estavam satisfeitas com o

tratamento, 47,6% apresentaram melhora na intensidade da perda urinária ao final da fase passiva e cura no final da fase ativa.

Peattie et al. (1988), realizaram um estudo utilizando os cones vaginais em 39 mulheres com incontinência urinária de esforço, que estavam na pré-menopausa. O tratamento foi realizado com o cone passivo durante um mês e posteriormente os exercícios de Kegel foram adicionados. Após a fase do cone, 70% apresentaram melhora ou cura da perda urinária. Na segunda fase, não foi observada melhora clínica provavelmente pela falta de conscientização perineal das pacientes.

Gameiro et al. (2010), compararam a eficácia dos cones vaginais com os exercícios preconizados por Kegel, em mulheres incontinentes, e obtiveram resultados positivos quanto a diminuição dos episódios de perda de urina, noctúria, urgência e sensação de umidade após 6 e 12 meses de tratamento. Além disso, no grupo de mulheres que realizaram exercícios padronizados para aumento da pressão abdominal associado aos cones vaginais, foi constatado melhores resultados quanto ao aumento de força muscular. Em um estudo semelhante, Matheus et al. (2006) demonstraram que um programa de exercícios terapêuticos com cones vaginais teve papel determinante na redução da perda urinária, diminuição da sensação de umidade e ganho de força muscular.

Cammu; Nylen. (1998), utilizaram em seu estudo 46 pacientes com incontinência, sendo que 16 foram tratadas com os cones vaginais e 30 com os exercícios do assoalho pélvico por 12 semanas. Inicialmente no grupo cones, foi utilizado o maior peso na fase passiva e, em seguida, na fase ativa. Seus resultados demonstraram que 39% das mulheres deste grupo apresentaram melhora dos sintomas na forma passiva e 29% na forma ativa. No estudo de Golmakani et al. (2014) as sessões de tratamento com os cones nas duas fases foram realizadas por 3 meses, obtendo-se aumento de força muscular após 8 e 12 semanas de intervenção.

Ainda não existe um consenso quanto a duração da terapia. Para um tratamento destinado a melhora da força muscular, a grande maioria dos estudos indicam a utilização do cone durante 15 a 30 minutos, duas vezes por dia, de uma a seis semanas ou pelo menos cinco meses (BO, 1995; PEREIRA et. al., 2012; GOLMAKANI et. al., 2014).

De acordo com Kondo et al. (1995), o uso dos cones vaginais apresenta menores riscos. Os efeitos colaterais mais comuns são dor local, infecção, sangramento e aumento da secreção vaginal, sendo observado em 10% das pacientes.

2.3 Microbiota fúngica vaginal

A microbiota vaginal é formada por microrganismos que vivem em adequado equilíbrio e apresentam funções fisiológicas que afetam diretamente a saúde das mulheres. Eles representam um importante mecanismo de defesa, mantendo o meio saudável e impedindo a proliferação de patógenos evidentes ou fornecendo proteção contra o crescimento excessivo de espécies potencialmente patogênicas. (ZHOU et al., 2004)

O ecossistema vaginal é um sistema dinâmico, formado pelo epitélio vaginal e pela microbiota da vagina. O epitélio vaginal não queratinizado estratificado, escamoso passa por mudanças estruturais que são influenciadas pelos níveis hormonais de estrógeno sendo um elemento base a ser considerado na microecologia vaginal. A vagina é habitada basicamente por espécies de *Lactobacilus*, porém uma diversidade de microrganismos aeróbicos e anaeróbicos já foi encontrada (BORIS; BARBÉS, 2000; CRIBBY; TAYLOR; REID, 2008), entre eles a *Candida albicans* (*C. albicans*), descrita na microbiota vaginal de mulheres adultas saudáveis em torno de 15% a 20% e em mulheres grávidas de 30% a 40%. Outras espécies como *glabrata* e *parapsilosis* são encontradas em proporções relativamente menores (GALLE; GIANINNI, 2004; ZHOU et al., 2004).

Os *Lactobacilus* apresentam uma importante ação protetora contra a invasão de agentes patogênicos através de mecanismos específicos que formam uma barreira que impede a colonização desses patógenos e participam da produção de compostos antimicrobianos como peróxido de hidrogênio, ácido láctico, bacteriocinas e biosurfactantes. Através da metabolização do glicogênio presente no epitélio vaginal, a produção desses compostos determina um pH vaginal mais baixo, tipicamente entre 4 e 4.5 em mulheres com idade reprodutiva (PYBUS; ONDERDONK, 1999; BORIS; BARBÉS, 2000; ZHOU et al., 2004; ÁLVAREZ-CALATAYUD et al., 2015).

A composição do ecossistema vaginal não é constante e sofre variações em resposta a fatores exógenos e endógenos. Tais fatores incluem as diferentes fases do ciclo menstrual, idade, menarca, gestação, infecções, uso de métodos contraceptivos, frequência das relações sexuais e número de parceiros, uso de determinados produtos vaginais, antibióticos ou outros medicamentos com propriedades imunossupressoras. Alterações do meio vaginal promovem flutuações no ambiente local e podem aumentar ou diminuir as vantagens seletivas de microrganismos específicos (WITKIN; LINHARES; GIRALDO, 2007; LINHARES; GIRALDO; BARACAT, 2010).

Neste contexto, *C. albicans* é tolerante ao meio ácido vaginal, porém em eventos que induzem um estado de imunossupressão ou quando a microbiota é alterada, cria-se condições adequadas para sua colonização e invasão nos tecidos do hospedeiro predispondo os indivíduos à várias doenças fúngicas, em particular as infecções nas mucosas, que incluem candidíases vaginais e infecções orais ou sistêmicas. (BERMAN; SUDBERY, 2002; WITKIN; LINHARES; GIRALDO, 2007; LINHARES; GIRALDO; BARACAT, 2010; GANGULY; MITCHELL, 2011; MAYER et al., 2013).

2.4 *Candida albicans* e infecções genitourinárias

Candida albicans é um fungo polimórfico, com capacidade de se adaptar a diferentes nichos biológicos e se diferenciar da forma unicelular leveduriforme para a forma filamentosa. As mudanças morfogênicas são consideradas importantes no processo de aderência e invasão ao hospedeiro, aumentando a virulência do fungo e o desenvolvimento de doenças sintomáticas (CHAFFIN et al., 1998; BRADFORD; RAVEL, 2017).

Esta espécie é uma das principais causas de infecções fúngicas invasivas e representa um grave problema de saúde pública devido às altas taxas de mortalidade, aumento dos custos de cuidados a pacientes submetidos a cirurgias e internamento hospitalar (SARDI et al, 2013). As diferenças na patogenicidade de isolados de espécies de *Candida* é determinada por fatores inerentes ao hospedeiro e uma série de fatores de virulência. A capacidade de *C. albicans* iniciar uma infecção depende das alterações fenotípicas e morfológicas, adesão e invasão aos tecidos, secreção de proteases e formação de biofilmes (MAYER et al., 2013).

O principal fator de virulência de *C. albicans* é a sua adesão a outros microrganismos, células do hospedeiro e superfícies abióticas. Essa ação é fundamental para a sua sobrevivência e pode ser mediada por uma variedade de proteínas expressa na superfície do patógeno. Das oito proteínas codificadas pela família de genes *Agglutinin-Like Sequence* (ALS), a Als3 é associada a forma de hifas sendo responsável pelo processo de adesão e invasão celular. A expressão da Als3, expressa na superfície de *C. albicans*, é regulada durante a infecção de células epiteliais orais in vitro e durante a infecção vaginal in vivo. Assim, o aumento da frequência dessa espécie neste tipo de infecções acontece pela maior capacidade de adesão de *C. albicans* em relação as outras espécies (ZIARRUSTA, 2002; MAYER et al., 2013).

Estima-se que 80% das infecções humanas é resultante de biofilmes patogênicos. Os biofilmes por *Candida* spp. em superfícies abióticas tem sido bastante estudados devido a sua associação com infecções sistêmicas e risco de vida (BLANKENSHIP; MITCHELL, 2006;

RAMAGE et al., 2005). A maioria das infecções da corrente sanguínea, pneumonia hospitalar, doenças infecciosas como a candidíase e infecções do trato urinário estão associadas ao uso de dispositivos médicos devido a capacidade que diversas espécies apresentam em formar extensos biofilmes (MUKHERJEE; CHANDRA, 2004; GASPARETTO et al., 2005; CUÉLLAR-CRUZ et al., 2012; SOUZA et al., 2016).

C. albicans está presente na mucosa vaginal de 20 a 30% das mulheres. Em condições normais, a colonização dessa espécie geralmente é inofensiva e não implica em quaisquer efeitos prejudiciais à saúde. No entanto, em indivíduos com deficiência imunológica, podem causar doenças. A formação de hifas e invasão das células epiteliais vaginais contribuem para o desenvolvimento de infecções vaginais sintomáticas. A candidíase vulvovaginal é frequente, atingindo 75% das mulheres em alguma fase da vida (WACHTLER et al., 2011; MAYER et al., 2013).

A infecção do trato urinário é o tipo mais comum de infecção nosocomial e 20% dessas infecções são causadas por *C. albicans*. A literatura mostra que *C. albicans* é a espécie mais comumente isolada do trato urinário sendo encontrada em cerca de 50% a 70% dos pacientes com candidúria. A candidúria é conhecida como a presença de espécies de *Candida* na urina. A presença de cateter urinário representa o fator de risco mais comum para candidúria em pacientes hospitalizados (TOMCZAK et al., 2014; BEHZADI et al., 2015). A patogênese da infecção do trato urinário, associada ao cateter, está relacionada com a suscetibilidade do material à aderência e proliferação microbiana (NETT et al., 2014). A natureza química do substrato pode influenciar na arquitetura, morfologia e espessura do biofilme formado por *Candida* spp. e desempenham um importante papel na virulência das infecções relacionadas ao uso do dispositivo (CHANDRA; MUKHERJEE, 2015).

2.5 Biofilmes por *Candida albicans*

Os biofilmes são agregados de microrganismos unicelulares que formam estruturas complexas, incorporadas dentro de uma matriz extracelular de substâncias poliméricas, com capacidade de aderir a um substrato ou a uma interface. O biofilme formado por fungos tem implicações clínicas importantes devido à estrutura de proteção proporcionada as células para suportar as condições ambientais adversas e atua como reservatórios para fontes de infecção persistentes (UPPULURI; PIERCE; LÓPEZ-RIBOT, 2009). Estas infecções são particularmente sérias, pois as células organizadas em biofilme se tornam resistentes aos antifúngicos e podem ocorrer em qualquer momento durante a implantação ou uso dos materiais (DOUGLAS, 2003; AULER et al., 2010).

O desenvolvimento do biofilme é considerado um processo gradual e dinâmico que envolve a adesão inicial, colonização, maturação e a produção de uma matriz extracelular (UPPULURI; PIERCE; LÓPEZ-RIBOT, 2009; HARRIOTT et al., 2010). Uma variedade de espécies fúngicas apresentam a capacidade para colonizar uma determinada superfície e formar biofilmes (CUÉLLAR-CRUZ et al., 2012; SARDI et al., 2014).

As espécies de *Candida* são frequentemente encontradas na microbiota humana normal tornando mais fácil a sua interação com a maioria dos biomateriais e superfícies do hospedeiro. A maioria dos estudos sobre biofilmes têm demonstrado que as espécies de *Candida*, principalmente a *C. albicans*, é um dos principais gêneros envolvidos na formação de biofilmes, sendo estes responsáveis por um grande número de infecções relacionadas à dispositivos médicos implantados constituídos por polimetilmetacrilato, elastômero de silicone, poliuretano, polipropileno, poliestireno, entre outros (CHANDRA et al., 2001; ESTIVILL et al., 2011; CUÉLLAR-CRUZ et al., 2012).

A formação de biofilme de qualquer microrganismo inicia com a adesão a um substrato externo, seguido pela proliferação das células em toda a superfície e modificação de sua morfologia (APARNA; YADAV, 2008). O desenvolvimento do biofilme por *C. albicans*

é dividido em três fases distintas e inicia quando as células de levedura se aderem à superfície do material. Após a aproximação das células, ocorre uma interação destas com a superfície, as células aderidas proliferam formando microcolônias e começam a produzir a matriz extracelular. Alguns mecanismos de comunicação intercelulares levam a uma expressão de diferentes genes que são responsáveis pela transição de leveduras para hifas, na arquitetura da parede celular e na coesividade do biofilme dada pela matriz (MUKHERJEE et al., 2005).

A adesão de células de *C. albicans* a substratos sólidos é mediada por proteínas da parede celular por diferentes tipos de ligações químicas sendo fundamental para a formação de biofilmes (CUÉLLAR-CRUZ et al., 2012). Alguns estudos indicam os papéis de proteínas Als e outras adesinas na formação de biofilmes. As proteínas específicas de Als estão presentes em *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* e são essenciais neste processo participando da codificação de muitas glicoproteínas de superfície. Em *C. albicans*, a família Als inclui oito membros (ALS1-ALS7 e ALS9) e sua expressão é regulada por fatores de transcrição. As proteínas ALS1 e ALS3 são importantes para formação de biofilmes in vivo e, quando reduzidas, formam um biofilme frágil (BLANKENSHIP; MITCHELL, 2006; NOBILE et al, 2008; SARDI et al., 2014).

Na última fase do desenvolvimento do biofilme o crescimento dos fungos dá origem à formação de um biofilme maduro, constituído por uma base de levedura envolta por uma matriz de substâncias extracelulares poliméricas que se prolonga para fora da superfície. Esse material extracelular é composto por polissacarídeos de parede celular contendo carboidratos, pequenas quantidades de proteínas, hexosamina, fosforo e ácido úrico. Essa estrutura funciona para manutenção da integridade do biofilme, defesa contra células fagocitárias e diminuição da difusão de substâncias no biofilme (DOUGLAS, 2003; BLANKENSHIP; MITCHELL 2006; APARNA; YADAV, 2008; HARRIOTT et al., 2010).

Modelos in vitro foram utilizados para analisar os estágios de desenvolvimento para a formação do biofilme de *C. albicans*. As principais características do biofilme maduro de *C. albicans* in vitro, após 48 horas de incubação, consiste de uma rede densa de leveduras, hifas e pseudo-hifas encapsuladas pela matriz extracelular. A formação de biofilmes por *C. albicans* desenvolve-se em três fases distintas: inicial (0 a 11 horas), intermediária (12 a 30 horas), madura (38 a 72 horas) e, sua estrutura é influenciada pelas características da superfície de contato (textura e natureza química), fatores ambientais, morfogênese de *Candida*, espécies de *Candida* envolvidas, tipo do material e localização do dispositivo (HAWSER; DOUGLAS, 1994; CHANDRA et al., 2001; JABRA-RIZK; FALKLER; MEILLER, 2004; MUKHERJEE et al., 2005; ESTIVILL et al., 2011). Superfícies de biomateriais com alta energia e com maior rugosidade promovem uma maior adesão de *C. albicans*. Além disso, a afinidade por superfícies acrílicas já foi demonstrada em infecções desencadeadas por colonização em cateteres, sondas e diversos tipos de próteses (BUSSCHER et al., 2010; CUÉLLAR-CRUZ et al., 2012).

2.6 Métodos de estudo de biofilme de leveduras

Várias metodologias vêm sendo desenvolvidas para o estudo da formação de biofilmes de espécies de *Candida*. Inicialmente, a maioria dos métodos foram adaptados de estudos desenvolvidos para o estudo dos biofilmes de bactérias, porém as estratégias têm sido aprimoradas com a finalidade de compreender melhor os elementos que controlam as interações entre o hospedeiro e o biofilme. Um elemento necessário é a capacidade de quantificar de forma precisa as células viáveis do biofilme, entretanto esses procedimentos são variáveis em relação ao tempo e custo (NIKAWA et al., 1996; BAILLIE; DOUGLAS, 2003; TAFF et al., 2012).

Entre os diferentes modelos de biofilmes *in vitro* estão os modelos fechados ou estáticos. Esses modelos possibilitam a quantificação direta e rápida da massa de biofilme formada ou de células viáveis. O método de microplacas para formação de biofilmes é bastante utilizado por ser considerado rápido, eficiente, confiável e reprodutível, com alto potencial de transferência. Este método permite a análise quantitativa do crescimento do biofilme pré-formado através do uso de corantes, como o cristal violeta, ou das células viáveis, pela redução de compostos de tetrazólio (PATHAK; SHARMA; SHRIVASTVA, 2012; RAMAGE et al., 2011; TAFF et al., 2012).

O método de coloração com cristal violeta permite quantificar o biofilme avaliando a absorção da solução de coloração com corante cristal violeta. Ensaio colorimétrico de viabilidade celular são importantes no estudo da atividade celular eucariótica. Uma das principais técnicas são os ensaios que envolvem a utilização de sais de tetrazólio que evoluíram a partir da descrição do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-íli)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) no início da década de 1980. A síntese de hidróxido de 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida (XTT) tornou-se importante para avaliação das atividades metabólicas das células, uma vez que o seu produto reduzido é solúvel em água. Após o processamento por células metabolicamente ativas, o sal de Tetrazólio é reduzido em Formazan, de cor marrom, que pode ser determinado por espectrofotometria num leitor de placas de microtitulação. Devido à sua facilidade de uso, os métodos MTT e XTT foram utilizados como ensaios de viabilidade de levedura mostrando uma excelente correlação entre a densidade celular e a atividade metabólica, que permite uma medida semiquantitativa da formação de biofilme. Para testes com cepas de *C. albicans*, o ensaio XTT foi considerado o mais reprodutível, preciso e eficiente para a medição da extensão do biofilme (TELLIER et al., 1992; KUHN et al., 2003; LAL et al., 2008; PIERCE et al., 2008).

Recentemente, sistemas tradicionais de células de fluxo laminar permitem a avaliação contínua da formação de biofilmes. Dispositivos microfluidicos fornecem um meio poderoso, altamente reprodutível, versátil e customizável, para o estudo do desenvolvimento de biofilmes, incluindo a aderência celular inicial, maturação e dispersão celular. Uma vantagem deste método é a possibilidade de analisar o desenvolvimento do biofilme em tempo real e os efeitos dos tratamentos de agentes antimicrobianos em condições fisiológicas observadas em contextos clínicos. Entretanto, os testes de tratamento com drogas precisam ser adaptados e realizados em menos de 16 horas (GULATI et al., 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Analisar o desenvolvimento de biofilme por *Candida albicans* na superfície de cones vaginais.

3.2 Específicos

- Produzir e avaliar a formação de biofilmes de *Candida albicans* na superfície de cones vaginais;
- Detectar a viabilidade celular do biofilme formado sobre a superfície de cones vaginais por meio do método MTT.
- Comparar a formação de biofilme por *Candida albicans* em relação as superfícies coloridas dos cones vaginais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Tipo e local do estudo

O presente trabalho trata-se de um estudo do tipo experimental e foi desenvolvido no Laboratório de Micologia Médica e Laboratório de Imunodiagnóstico do Departamento de Micologia, Centro de Biociências, pertencente à Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

4.2 Cone Vaginal

Foram utilizados cones vaginais do Kit FemCone Quark Medical® (Piracicaba/SP, Brasil) devidamente registrados na agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA) e atendem as normas Brasileiras NBR ISO 9001, NBR ISO 13485 e Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 059/2014.

O Kit é composto por cinco cones coloridos, constituídos por um termoplástico (Acrilonitrila Butadieno Estireno), tamanho 5 cm, dimensões 19x12x6 cm e com pesos que variam entre 20 gramas a 70 gramas (Rosa: 20 g; Amarelo: 32 g; Branco ou Bege: 45 g; Verde ou Lilás: 57 g; Azul ou vermelho:70 g) (Figura 1).

Figura 1: Cones vaginais de pesos variados marca FemCom- Quark Medical.
Fonte: próprio autor



4.3 Leveduras

Para a formação do biofilme “in vitro” foram utilizados isolados de leveduras do gênero *Candida* obtidas da Coleção de Culturas URM do Departamento de Micologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco. *Candida albicans* ATCC 90028 foi utilizada como cepa de referência.

As linhagens referências das espécies selecionadas e incluídas neste estudo, assim como o número de identificação das sequencias obtidas na coleção, substrato e ano de estocagem, estão sumarizadas na Tabela 1.

Todas as amostras de *C. albicans* foram mantidas em tubos de ensaio contendo meio de cultura Ágar Sabouraud dextrose acrescido de extrato de leveduras, a uma temperatura de 37°C em atmosfera de ar por três meses anterior aos testes.

TABELA 1: Linhagens obtidas da Coleção de Cultura URM utilizadas no estudo.

Código de Identificação	Espécie	Substrato	Estocagem (Ano)
URM 743	<i>C. albicans</i>	Secreção Vaginal	1957
URM 4986	<i>C. albicans</i>	Secreção Vaginal	2005
URM 4987	<i>C. albicans</i>	Secreção Vaginal	2005
URM 4990	<i>C. albicans</i>	Secreção Vaginal	2005
URM 5900	<i>C. albicans</i>	Secreção Vaginal	2009
URM 5974	<i>C. albicans</i>	Secreção Vaginal	2009

4.4 Preparo e padronização das suspensões de *Candida*

As Cepas de *Candida albicans* foram semeadas individualmente em placas de Petri (90x15 mm) contendo Ágar Sabouraud Dextrose e, em seguida, incubadas a uma temperatura de 37°C durante 24 horas. Após o crescimento das culturas, foram preparadas suspensões de células de levedura com concentração ajustada, em espectrofotômetro 530 nm, em um comprimento de onda de 0,5 na escala de MacFarland, em 3 mL de solução salina.

4.5 Preparação dos segmentos dos cones vaginais

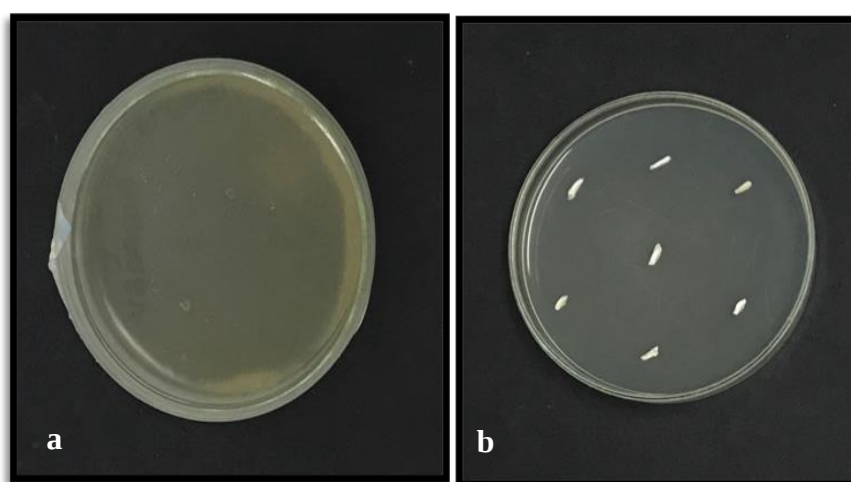
Os cones vaginais foram previamente higienizados com água e detergente líquido neutro. Após serem enxaguados, foram seccionados em fragmentos de 1 cm de comprimento e transferidos para Erlenmeyers contendo álcool 70% por 30 minutos. Em seguida, o álcool foi aspirado e adicionou-se água destilada para serem esterilizados em autoclave à uma temperatura de 121°C por 30 minutos (Figura 2). A confirmação da esterilização foi realizada incubando-se os fragmentos do cone em placas de Petri contendo Ágar Sabouraud Dextrose acrescido de 50 mg/mL de meio de cultura de cloranfenicol e mantidas à 37 °C por até 15 dias (Figura 3).

Posteriormente, os fragmentos foram introduzidos individualmente em poços de microplacas de fundo chato (96 poços), sendo três amostras destinadas a análise por meio de cultura, três amostras à análise da viabilidade celular pelo método de redução de sal MTT e três amostras ao controle negativo.

Figura 2: Fragmentos de cones vaginais submersos em água destilada após processo de esterilização em autoclave.
Fonte: próprio autor



Figura 3: Placas de cultura contendo água destilada (a) e fragmentos dos cones vaginais (b), em meio Àgar Sabouraud Dextrose acrescido de cloranfenicol, incubadas à 37°C, após procedimento de esterilização em autoclave. Fonte: próprio autor



4.6 Avaliação da Produção de biofilme

- Avaliação qualitativa da formação do biofilme por *C. albicans*

A avaliação qualitativa da capacidade de formação de biofilme em superfície de poliestireno de poços de microplacas, foi realizada utilizando o método visual adaptado de Shin et al. (2002). Após semeio dos isolados em meio ágar Sabouraud e preparo das

suspensões descrita acima, 20µl foram inoculados em 180µl de Sabouraud líquido contido nos poços das microplacas, as quais foram mantidas a 35°C por 24h e 48h sem agitação. Em seguida, o conteúdo foi aspirado e os poços lavados com água destilada esterilizada e, sobre estes, adicionado o corante Fucsina (QEEL-Química Especializada Erich Ltda., São Paulo, Brasil) para realização de avaliação de acordo com a intensidade da coloração. A capacidade em corar foi avaliada visualmente e classificadas da seguinte forma: 1) Fortemente corado: quando o biofilme foi corado de forma intensa, possibilitando a correta determinação do contorno das áreas contendo biofilme; 2) Coloração mediana: quando o biofilme foi corado de forma mais fraca, mas ainda possibilitou a determinação do contorno das áreas com biofilme; 3) Fraca coloração: quando o biofilme não foi corado, impossibilitando a distinção da cor da placa e a cor característica do corante. A interpretação representou uma atividade forte, moderada e fraca de formação de biofilme, respectivamente.

- Avaliação quantitativa da formação do biofilme por *C. albicans* usando coloração cristal violeta (PFALLER et al., 1995; RUIZ et al., 2013)

O desenvolvimento de biofilme foi quantificado pelo método de coloração cristal violeta em superfície de poliestireno de poços de microplacas. De cada suspensão de *Candida albicans* preparadas em água salina (NaCl à 0,85% g/L), quantias de 20 µL foram transferidas para os poços das microplacas contendo 180 µL de Sabouraud líquido e incubadas a 37°C durante 24 e 48 horas. Após o tempo de incubação, as culturas foram cuidadosamente aspiradas e os poços lavados duas vezes com 200 µL de tampão PBS estéril.

O poços pré-lavados foram corados com 110 µL de solução cristal violeta aquosa a 0,4% durante 45 min. Após esta etapa, os micropoços foram lavados três vezes com 200 µL de água ultrapura (Milli-Q) estéril e o biofilme descolorido pela adição de 200 µL de etanol por 45 minutos. Ao final, 100 µL de cada poço foram transferidos para uma nova microplaca

sendo a formação do biofilme avaliado através da diferença de densidade óptica entre o biofilme formado e o poço controle, pela leitura em espectrofotômetro ajustado com comprimento de onda de 595 nm. Cada linhagem foi testada oito vezes e os valores de absorbância do poço controle foram subtraídos aos dos poços teste para minimizar interferências. a quantificação da produção de biofilme foi realizada através da média aritmética da absorbância dos 8 testes.

4.7 Avaliação da Capacidade de Formação de Biofilme na Superfície dos Cones Vaginais (RAMAGE et al., 2002; KROM et al., 2006; PIERCE et al., 2008).

Para a fase de produção de biofilme na superfície dos cones, quantias de 100 µL de cada suspensão das cepas selecionadas, contendo 10^6 células/ml em RPMI tamponado com HEPES, foram transferidas para os poços das microplacas, contendo os fragmentos dos cones vaginais, e colocadas em incubadora refrigerada com agitação a 75 rpm, 37°C, durante 2 horas. Em seguida, os poços foram lavados três vezes com tampão fosfato (PBS), 200 µL do meio RPMI tamponado com HEPES foi adicionado e as placas incubadas durante 24 horas e 48 horas à 37°C para posterior avaliação. O isolado de *C. albicans* ATCC 90028 foi utilizado como controle.

A quantificação dos biofilmes foi realizada com o ensaio de redução de sal de 1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan (MTT- Sigma Chemical), onde 20 µL, na proporção de 5 µL para 1mL de tampão PBS, esterilizado por filtração em membrana (Millipore, poros de 0,22µm) foi adicionado à cada poço da placa de microtitulação e incubadas por 18 horas à 37°C. Após aspiração do corante, adicionou-se 200 µL de isopropanol durante 15 minutos. Ao final, 100 µL foi transferido do conteúdo de cada poço para uma nova placa de microtitulação afim de proceder à leitura em leitor de microplacas com 570 nm de comprimento de onda.

Após quantificação e identificação dos isolados com menor e maior capacidade de formação de biofilme, foi realizado um novo teste utilizando as cinco cores dos cones para cada linhagem com o objetivo de avaliar se a quantidade de biofilme sofre influência dos dispositivos coloridos.

4.8 Análise Estatística

Para a análise estatística utilizou-se o Software R. 3.4.3. Os dados foram registrados em planilhas utilizando Microsoft Excel 2003 e o nível de significância adotado foi de 5% ou 0,05.

As variáveis dependentes (tempo de incubação e desenvolvimento de biofilme) e independentes (atividade do biofilme) foram analisadas estatisticamente.

Os valores de absorbância, obtidos pelo método do Cristal violeta, para avaliação da habilidade de formação de biofilme entre as espécies, foram analisados por meio do teste ANOVA (On Way). O teste de comparações múltiplas (Tukey) foi utilizado, após a ANOVA, para comparação das médias encontradas, uma a uma.

A comparação das médias da atividade metabólica das células e biofilme formado sobre os cones vaginais entre espécies de *Candida albicans* também foram analisadas por meio do teste ANOVA e o teste de Tukey para comparação das medias, sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk. Os tratamentos foram comparados entre si através do teste *t* student (teste-T).

5 RESULTADOS - ARTIGO ORIGINAL

MODELO BIOLÓGICO *IN VITRO* DE BIOFILME POR *CANDIDA ALBICANS* EM CONES VAGINAIS

Vanessa Pontes,¹ Mayara Moura,¹ Patrícia Lima,¹ Franz de Assis Santos,² Maria Daniela Buonafina,³ e Rejane Neves^{1,2,3}.

¹Programa de Pós-graduação em Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil

²Departamento de Biologia de Fungos, Centro de biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil

³Departamento de Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil

Corresponding Author:

Rejane Pereira Neves

rejadel@yahoo.com.br

Laboratório de Micologia Médica- Departamento de Micologia – Universidade Federal de Pernambuco

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n, 50670-420. Cidade Universitária, Pernambuco, Brasil

Fone/FAX: +55 (81) 21268482

A Incontinência Urinária é considerada como perda involuntária de urina. Mulheres com incontinência urinária de urgência podem apresentar infecções do trato urinário associada, aumentando os episódios de perda e piora clínica do quadro. *Candida albicans* faz parte da microbiota normal da mucosa vaginal e a sua capacidade de aderir e formar biofilmes é um dos seus principais fatores de patogenicidade. Os biofilmes são agregados de microrganismos que podem aderir entre si e formar estruturas mais complexas em superfícies de biomateriais, induzindo o desenvolvimento de infecção. Aqui demonstramos a formação de biofilme nos cones vaginais utilizados em mulheres incontinentes. Os biofilmes de *Candida albicans* foram testados sobre segmentos dos cones após 24 e 48 horas de incubação. Os isolados estudados formaram biofilme mostrando diferenças estatisticamente significativas. Esses resultados revelam o papel do biofilme como fonte de infecção neste material e contribuem para o desenvolvimento de estratégias que auxiliem na terapêutica e diminuição da ocorrência de infecções de pacientes com incontinência urinária.

INTRODUÇÃO

A Incontinência Urinária (IU) é definida, pela *International Continence Society* (ICS), como perda involuntária de urina, objetivamente demonstrável, considerada um problema social ou até mesmo higiênico (Abrams et al., 2003). A IU é considerada um importante problema de saúde na comunidade, sendo uma condição que gera alto grau de desconforto, perda de autoconfiança, constrangimento social, isolamento, redução das atividades diárias,

sociais e sexuais, além de interferir negativamente na qualidade de vida do indivíduo (Abrams et al., 2003; Tosun et al., 2016).

A prevalência da IU na população varia de acordo com o sexo e a idade. No Brasil, foi observado uma maior prevalência da IU em mulheres, com diferentes tipos e formas da doença. No município de São Paulo, um estudo registrou um índice de 26,2% em mulheres idosas, acima de 60 anos (Amaro et. al, 2009; Tamanini et. al, 2009; Santos; Santos, 2010).

De acordo com a ICS, o tipo de IU mais prevalente na mulher é a incontinência urinária de esforço (IUE), seguido da incontinência urinária mista (IUM) e incontinência urinária de urgência (IUU). Estima-se que 51% das mulheres com queixas urinárias apresentam a IUE (Mota, 2017). Na IUE ocorre perda de urina aos esforços, por exemplo, ao tossir, espirrar, pular, deambular, mudar de decúbito e rir, estando relacionada com a diminuição da força de fechamento uretral, diante de aumentos transitórios da pressão intra-abdominal, na ausência de contração do músculo detrusor. A IUU é mais frequentemente relacionada à hiperatividade do detrusor e caracteriza-se pela perda de urina acompanhada e/ou imediatamente precedida de urgência. A IUM representa a combinação dos sintomas da IUE associada à urgência (Berquó; Ribeiro; Amaral, 2009; Khandelwal; Kistler, 2013; Maclachlan; Rovner, 2015).

Existem alguns fatores de risco diretamente relacionados com as alterações da função esfíncteriana que propiciam o surgimento da IU e que são associados aos sintomas geniturinários. Nos últimos anos, há evidências consistentes sugerindo que os fatores anatômicos, idade avançada, hereditariedade, multiparidade, tipo de parto, traumas pélvicos, constipação intestinal, alto índice de massa corporal, doenças crônicas e histórico de infecção do trato urinário podem contribuir para mudanças da função vesical e perda dos mecanismos esfíncterianos. (Rodhe et. al, 2008; Amaro et. al, 2009; Oliveira et. al, 2010; Carvalho et. al, 2014; Sumardi et al., 2014; Pizzoferrato et. al, 2015; Nojavan et. al, 2015; Singh et al., 2015; Tosun et al., 2016).

Infecções do trato urinário (ITU) são comuns em mulheres que apresentam distúrbios do assoalho pélvico ou aquelas submetidas a algum tipo de instrumentação do trato urinário (Coyne et al., 2013; Brubaker et al., 2014; Subramaniam, 2016). Entre as mulheres idosas que vivem na comunidade, as infecções do trato urinário estão associadas às perdas de urina frequentes, principalmente nos casos de incontinência urinária de urgência (Rodhe et. al, 2008; Silva; D'elboux, 2012). Cerca de 10% a 15% dos pacientes com sintoma de perda de urina ocasionada por bexiga neurogênica morrem de sepse de origem urinária (García-Leoni et al., 2003). A relação entre a infecção e a gravidade da incontinência urinária feminina, bem como suas implicações clínicas, ainda não são claras, porém já foi verificado que a perda de urina ocorre com maior pressão vesical em pacientes com história de ITU e que vazamentos frequentes podem estimular a subida de microrganismos. Ademais, comunidades bacterianas, virais e fúngicas podem estar associadas a sintomas pré-tratamento da IUU e à possível proteção contra a ITU (Pearce; Hilt; Rosenfeld, 2014; Brubaker; Wolfe, 2015; Heydari; Motaghedi; Abbaszadeh, 2016).

A microbiota vaginal é formada por microrganismos que vivem em adequado equilíbrio e apresentam funções fisiológicas que afetam diretamente a saúde das mulheres. Sua composição não é constante e alguns fatores exógenos e endógenos podem provocar flutuações na colonização vaginal e aumentar ou diminuir as vantagens seletivas para microrganismos específicos, criando condições adequadas para sua proliferação e formação de biofilmes (Witkin; Linhares; Giraldo, 2007; Linhares; Giraldo; Baracat, 2010; Zhou et al., 2004).

Os biofilmes são agregados de microrganismos unicelulares que formam estruturas complexas, incorporadas dentro de uma matriz exopolimérica de substâncias extracelulares, com capacidade de aderir a qualquer superfície sólida (Jabra-Rizk; Falkler; Meiller, 2004;

Blankenship; Mitchell, 2006; Silva et al., 2009). Estudos têm demonstrado que uma variedade de bactérias e fungos apresenta a capacidade de formar biofilmes na superfície de biomateriais (Auler et al., 2010; Harriott et al., 2010; Cuéllar-Cruz et al., 2012; Koch; Bürgers; Hahnel, 2013; Sardi et al., 2014). As espécies de *Candida*, principalmente a *C. albicans*, estão envolvidas na formação de biofilmes, constituindo uma importante fonte de infecção relacionadas a dispositivos médicos implantados (Chandra et al., 2001; Estivill et al., 2011; Cuéllar-Cruz et al., 2012).

Os cones vaginais são dispositivos cônicos, de mesma forma e volume, com peso variado e representam uma forma prática de identificar e fortalecer a musculatura do assoalho pélvico em mulheres incontinentes (Peattie; Plevnik; Stanton, 1988; Bo, 1995; Santos et al., 2009; Haddad et al., 2011; Oblasser; Christie; Mccourt, 2015). Este dispositivo é inserido no canal vaginal com o objetivo de promover um biofeedback sensorio-motor, que estimula as contrações dos músculos do assoalho pélvico para impedir o deslizamento do cone para fora da vagina (Seo; Yoon; Kim, 2004; Matheus et al., 2006; Santos et al., 2009; Silva; Oliva, 2011; Greer; Smith; Arya, 2012; Oblasser; Christie; Mccourt, 2015).

Nessa perspectiva, como o cone vaginal é um recurso amplamente utilizado no tratamento da IU, bem como o contato direto do mesmo com a mucosa vaginal, o objetivo do estudo foi analisar o desenvolvimento de biofilme por *Candida albicans* na superfície de cones vaginais. Diferentes metodologias *in vitro* e *in vivo* são utilizadas para avaliar a densidade, composição e morfologia de biofilmes. No entanto, ainda não existem estudos que relatem a adesão de biofilmes vaginais neste dispositivo.

RESULTADOS

Produção de biofilme

Avaliação qualitativa do desenvolvimento do biofilme de *C. albicans*

Os resultados da avaliação qualitativa em placa de poliestireno, obtidos por método visual, da classificação das espécies quanto à capacidade de formar biofilme estão apresentados na Tabela 1 e Tabela 2.

Tabela 1: Avaliação qualitativa da capacidade de formação de Biofilme dos isolados de *C. albicans* obtidos de secreção vaginal e estocados na URM, após aplicação do corante Fucsina a partir de 24h de incubação.

Registro URM	Espécie	Biofilme		
		Fraco	Moderado	Forte
5974	<i>C. albicans</i>			
5900	<i>C. albicans</i>			
4990	<i>C. albicans</i>			
4987	<i>C. albicans</i>			
4986	<i>C. albicans</i>			
743	<i>C. albicans</i>			
ATCC 90028	<i>C. albicans</i>			

Tabela 2: Avaliação qualitativa da capacidade de formação de Biofilme dos isolados de *C. albicans* obtidos de secreção vaginal e estocados na URM, após aplicação do corante Fucsina a partir de 48h de incubação.

Registro URM	Espécie	Biofilme		
		Fraco	Moderado	Forte
5974	<i>C. albicans</i>		■	
5900	<i>C. albicans</i>			
4990	<i>C. albicans</i>			
4987	<i>C. albicans</i>			
4986	<i>C. albicans</i>	■		
743	<i>C. albicans</i>			■
ATCC 90028	<i>C. albicans</i>	■		

Em nosso estudo, todos os isolados de *Candida albicans*, foram capazes de produzir biofilme. Proporcionalmente, as espécies de *C. albicans* apresentaram comportamento diferentes. No biofilme avaliado em 24 horas, cinco (71, 42%) isolados demonstraram fraca capacidade de formação de biofilme e apenas um (14,28%) mostrou capacidade forte. Todos os isolados de *C. albicans* apresentaram capacidade moderada de formação dessa estrutura, a exceção de um, que mostrou capacidade forte. Comparativamente, no biofilme avaliado após 48 horas, quatro (57,14%) revelaram capacidade moderada de formação de biofilme (Figura 1).

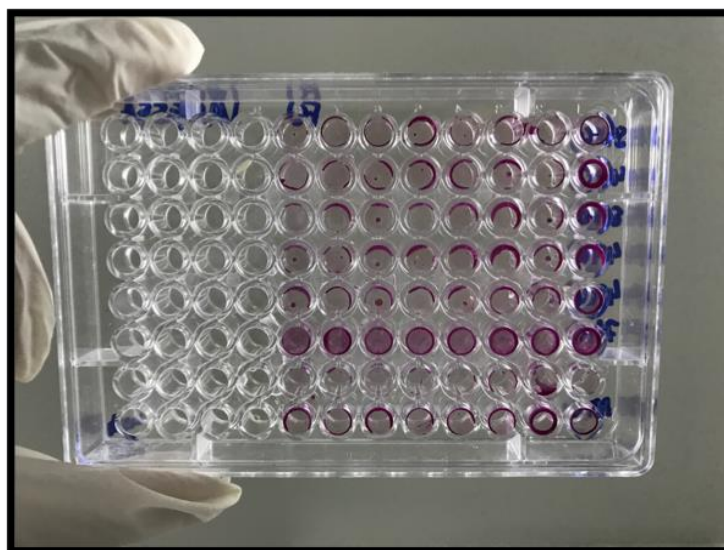


Figura 1: Avaliação qualitativa da capacidade de formação de biofilmes por *C. albicans*, através da avaliação visual com corante fucsina, após 48 horas de incubação em microplaca. Fonte: próprio autor

Avaliação quantitativa do desenvolvimento do biofilme de *C. albicans*

Método de coloração Cristal Violeta

O desenvolvimento do biofilme das cepas de *C. albicans* foi avaliada nas condições de incubação a 37°C durante 24h e 48h usando o método de coloração cristal violeta. Houve diferença estatisticamente significativa nas médias dos períodos de formação do biofilme em 24h ($p=5,32E-12$) e 48h ($p=2,18E-11$). Na figura 2, é possível evidenciar que todas as cepas de *Candida albicans* formaram biofilme para cada intervalo de tempo, embora tenham sido notados níveis médios de quantificação do biofilme diferentes. A produção de biofilme para maioria dos isolados aumentou gradualmente de acordo com o tempo. O biofilme formado por *C. albicans* URM 743 produziu o maior nível de absorvância, que foram estatisticamente maiores quando comparados com as demais espécies, incluindo a cepa de referência ATCC 90028. Dessa forma, a biomassa total formada por este isolado foi maior.

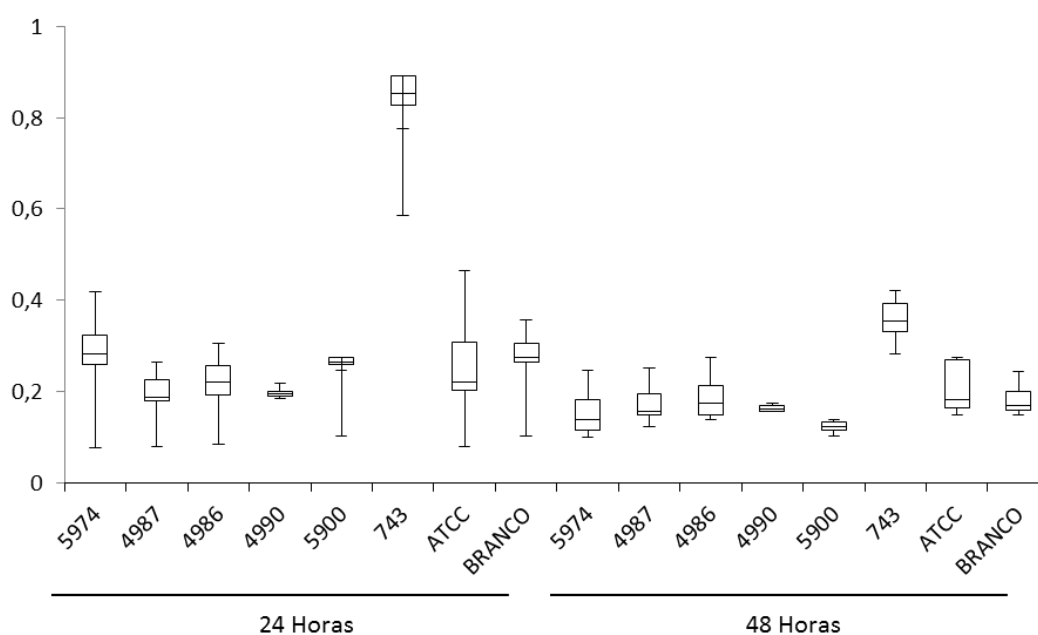


Figura 2: Boxplot dos valores médios de absorvância das soluções do Cristal Violeta (Abs CV) obtidos após 24 e 48 horas em biofilme formado pelos isolados de *Candida albicans* de origem vaginal.

Comparação das médias de formação de biofilme entre espécies de *C. albicans*

A comparação das médias de aderência e formação de biofilme entre os isolados de *Candida albicans* no período de 24h e 48h estão apresentados na tabela 3 e 4, respectivamente. É possível observar que houve diferenças significativas entre os isolados quanto a produção de biofilme. Em ambos os intervalos de tempo, a cepa *C. albicans* 743 foi a que mais se destacou, apresentou maior crescimento em relação aos demais.

Tabela 3: Comparação entre as médias de formação dos biofilmes formados por isolados de *Candida albicans* pelo teste de TUKEY.

Isolados	URM 4986	URM 4987	URM 4990	URM 5900	URM 5974	URM 743	ATCC 90028
URM 4987	S	-					
URM 4990	S	S	-				
URM 5900	S	S	S	-			
URM 5974	S	S	S	S	-		
URM 743	NS	NS	NS	NS	NS	-	
ATCC 90028	S	S	S	S	S	NS	-

S – significativo ($p < 0,05$); NS – não significativo

Tabela 4: Comparação entre as médias de formação dos biofilmes formados por isolados de *Candida albicans* pelo teste de TUKEY.

Isolados	URM 4986	URM 4987	URM 4990	URM 5900	URM 5974	URM 743	ATCC 90028
URM 4987	S	-					
URM 4990	S	S	-				
URM 5900	NS	S	S	-			
URM 5974	NS	S	S	S	-		
URM 743	NS	NS	NS	NS	NS	-	
ATCC 90028	S	S	S	NS	NS	NS	-

S – significativo ($p < 0,05$); NS – não significativo

Metodo de redução MTT

Os resultados das médias de absorbância final das suspensões de cada isolado, obtida após a remoção do biofilme aderido na superfície dos cones vaginais, estão representados na Figura 3.

Após 24h, os resultados dos valores médios de absorbância dos isolados cultivados nos cones vaginais revelaram uma atividade metabólica biológica estatisticamente significativa ($p = 0,0206$), indicando que pelo menos 2 isolados diferem estatisticamente de zero. Além disso, as cepas de *Candida albicans* exibiram um comportamento mais homogêneo ($p = 0,094$), sendo todas as cepas formadoras de biofilme. Ainda é possível notar que a atividade celular para *Candida albicans* 4986, *Candida albicans* 6974 e a cepa de referência ATCC 90028 foram os que mais apresentaram variação nos dados que vão de 0.7 a 2.7. A atividade celular dos isolados testados em 48h não apresentaram resultados estatisticamente significante ($p = 0,1678$) em biofilme formado sobre o cone.

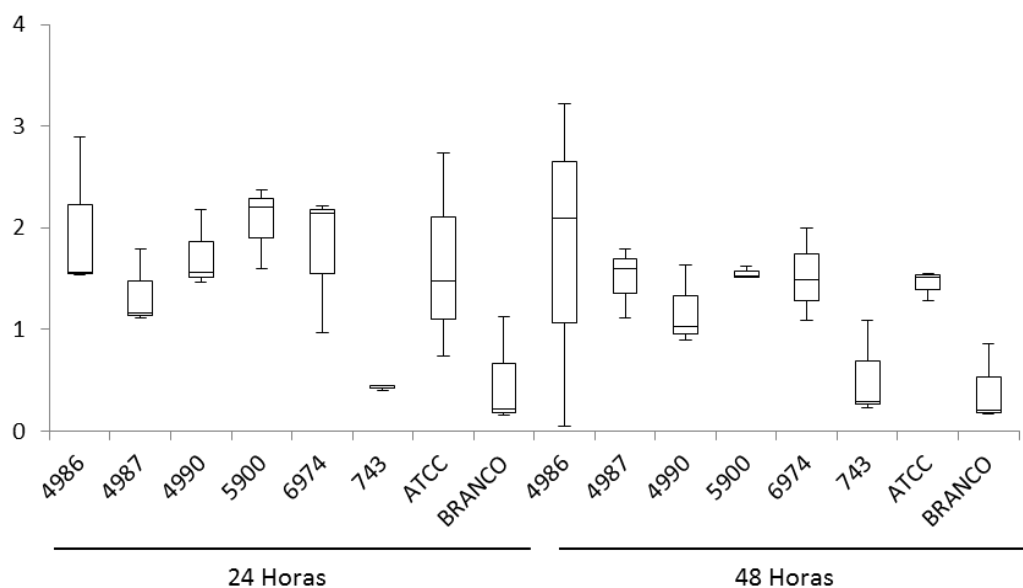


Figura 3: Boxplot da atividade metabólica (valores médios de absorvância) de células viáveis do biofilme formado pelos isolados de *Candida albicans* na superfície dos cones vaginais durante 24 e 48 horas obtidos através do método de redução de sal MTT.

Boxplot dos valores médios de absorvância das soluções do Cristal Violeta (Abs CV) obtidos após 24 e 48 horas em biofilme formado pelos isolados de *Candida albicans* de origem vaginal.

Comparação das médias de formação de biofilme sobre os segmentos de cone vaginais entre espécies de *C. albicans*

No tempo de 24 horas verificou-se maior atividade metabólica das células em biofilme formado sobre os segmentos do cone vaginal. Após 48 horas essa atividade diminuiu, exceto para *C. albicans* 4987 e *C. albicans* 743 (Tabela 5). Os resultados mostraram que a medida em que o tempo de incubação do material aumentou, menor foi a atividade metabólica das células em biofilme para a maioria dos isolados testados.

Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nas médias dos períodos de formação do biofilme. A atividade metabólica foi significativamente maior para as cepas de *C. albicans* 4990 e *C. albicans* 5900 no estágio de crescimento de 24 horas e para *C. albicans* 4987, *C. albicans* 6974 e cepa de referencia ATCC 90028 em 48 horas. *C. albicans* 743 apresentou diferença estatística significativa em ambos os períodos de formação do biofilme.

Tabela 5: Valores de absorvância obtidos do biofilme dos isolados de *C. albicans* formado sobre a superfície do cone vaginal, incubadas a uma temperatura de 37° C para 24h e 48h, conforme determinado no teste MTT. Os dados são expressos através de médias e os respectivos desvios padrões (Média $\pm$ DP).

Isolados	37° C	
	Tempo (horas)	
	24	48
URM 4986	1.99 $\pm$ 0.78	1.79 $\pm$ 1.61
URM 4987	1.36 $\pm$ 0.38	1.50 $\pm$ 0.35*
URM 4990	1.74 $\pm$ 0.39*	1,19 $\pm$ 0.39
URM 5900	2.06 $\pm$ 0.41*	1.55 $\pm$ 0.06
URM 6974	1.78 $\pm$ 0.70	1.52 $\pm$ 0.46*
URM 743	0.43 $\pm$ 0.02*	0.54 $\pm$ 0.47*
ATCC 90028	1.65 $\pm$ 1.01	1.45 $\pm$ 0.15*

* indica uma diferença significativa (p-valor<0,05)

A densidade do biofilme, após a remoção da biomassa aderida à superfície do cone vaginal, também foi correlacionada ao tempo de maturação e as diferentes cores do dispositivo (Figura 5). Verificou-se uma maior taxa de atividade celular do biofilme pelo isolado *Candida albicans* 5900 cultivado nos cones amarelo, vermelho e branco, nas primeiras 24h. Entretanto, nos biofilmes formados por *Candida albicans* 743 e *Candida albicans* 4986 a atividade celular foi maior após 48h de crescimento quando comparado com o de 24 h em todas as cores dos cones.

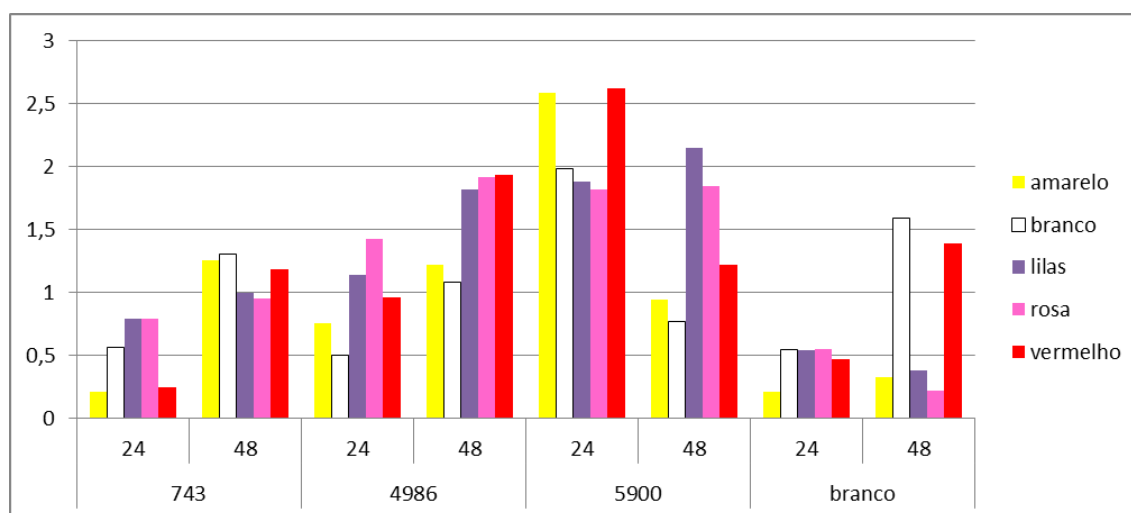


Figura 4: Resultados da absorvância (células viáveis) obtidos por espectrofotometria a 570 nm após 24h e 48h de formação de biofilme por *C. abicans* 743, *C. albicans* 4986, *C. albicans* 5900 na superfície dos cones vaginais pelo método MTT. Os níveis de absorvância correlacionam-se com o tempo de maturação dos isolados testados em horas e as cores do cone.

DISCUSSÃO

Uma das principais características de virulência de *Candida* spp. é sua capacidade de aderir e formar biofilmes em uma variedade de superfícies bióticas e abióticas. Esta característica pode causar um grande número de infecções e contribui para o aumento das taxas de mortalidade. A proteção das células contra as agressões ambientais e respostas imunes do hospedeiro, a resistência a medicamentos antifúngicos e a capacidade de promover infecções persistentes, tornam o biofilme um importante problema clínico (Silva et al., 2009; Lohse et al., 2018).

C. albicans são os patógenos fúngicos mais comuns isolados de pacientes com infecções relacionadas ao uso de dispositivos médicos superficiais e invasivos. Estudos anteriores mostram que isolados de *C. albicans* são bons formadores de biofilme em cateteres venosos e urinários, dispositivos cardiovasculares, próteses e implantes dentários (Gasparetto et al., 2005; Mukherjee et al., 2005; Ramage et al., 2005; Tammer et al., 2014). Um estudo da aderência de *C. albicans* em cateteres urinários demonstrou que cateteres de látex são mais suscetíveis à formação de biofilme do que os cateteres de silicone (Hawser; Douglas, 1994).

A presença do dispositivo pode provocar mudanças na microbiota local e permite que determinados microrganismos cresçam na sua superfície e produzam biofilmes. Auler et al. (2010) analisou a presença de biofilme na superfície de dispositivos intrauterinos (DIU) como um possível fator para candidíase vulvovaginal recorrente e sugeriu que a presença de biofilme neste dispositivo serviu como um reservatório de leveduras contribuindo para a infecções de repetição por *Candida albicans*.

O desenvolvimento do biofilme de *Candida albicans*, acontece de forma sequencial sendo dividido em quatro estágios: aderência, proliferação, maturação e dispersão (Mayer et al., 2013). A formação do biofilme inicia com a aderência das células de levedura na superfície do substrato e desenvolvimento de blastosporos em microcolônias distintas. Após a aderência, ocorre a proliferação destas células e formam-se pseudo-hifas e hifas na parte superior do biofilme e dispersão das células do biofilme maduro. O biofilme é considerado maduro após aproximadamente 24 horas e é caracterizado por uma rede densa de células de levedura, pseudo-hifas e hifas envoltas por uma matriz extracelular composta de proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos (Pierce et al., 2017; Lohse et al., 2018).

Devido a importância do processo de aderência, são utilizados atualmente modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* para quantificar, caracterizar e investigar o tempo de crescimento do biofilme por *C. albicans* formados em superfícies celulares e dispositivos médicos. Foi demonstrado que a formação do biofilme em tiras de polimetilmetacrilato ocorre em três etapas: fase precoce em 0-11 horas, fase intermediária entre 12-30 horas e fase de maturação em torno de 38-72 horas (Chandra et al., 2008). Desta forma, no presente trabalho foram selecionadas as cepas de leveduras sendo os períodos de tempo 24 e 48 horas determinados para caracterizar as fases de crescimento do biofilme.

Nos ensaios de biofilme *in vitro* a adesão de células de leveduras a uma superfície sólida geralmente é induzida durante 1-1,5h. Após a lavagem para remoção das células não aderidas ou que aderiram fracamente, a etapa de maturação é realizada com agitação da superfície tipicamente em 24-48 horas. Os biofilmes de *Candida albicans* podem se formar em diferentes materiais de superfície, diferentes meios de crescimento, temperaturas e diferentes taxas de agitação (Lohse et al., 2018). No entanto, este é o primeiro estudo sobre a formação de biofilmes por *C. albicans* em cones vaginais.

Shin et al. (2002) aplicaram um protocolo de fácil execução e alta reprodutibilidade para induzir a produção de biofilme em dispositivos médicos. A metodologia empregada é indicada para estudos comparativos sendo possível considerar, através da leitura em 24 horas, a aderência e formação de um biofilme maduro. Sob as condições do nosso estudo, quanto à

positividade em relação à produção de biofilme de um modo geral, todas as cepas de *Candida albicans* testadas e cepa de referência *Candida albicans* ATCC 90028, foram produtoras de biofilme. Ao compararmos a habilidade de formação, após 24 horas e 48 horas de incubação, houve diferenças nas taxas de crescimento entre as espécies estudadas. Inicialmente 71,42% dos isolados demonstraram fraca capacidade de formação de biofilme. A medida que a maturação do biofilme ocorreu ao longo de 48 horas, a formação de biofilme em 57,14% dos isolados aumentou (capacidade moderada).

Além disso, medimos a produção de biofilme pelo método de absorção do corante cristal violeta. Este método determina o volume de biofilme através do nível de absorbância da solução contendo o corante (Kuhn et al., 2003). Os resultados do nosso estudo mostram que as espécies de *C. albicans* foram capazes de produzir biofilme no tempo de 24 h e 48 h de incubação. O volume de biofilme formado pela cepa *C. albicans* 743 foi superior as demais cepas em cada tempo avaliado. Porém o volume formado pela maioria dos isolados foi inferior no tempo de 48 horas quando comparado ao volume após 24 horas, exceto para *C. albicans* 5900 e *C. albicans* 5974.

A técnica de redução de sal MTT foi utilizada para avaliar a atividade do biofilme formado. Os ensaios de viabilidade celular através dos métodos MTT e XTT indicam uma correlação entre a densidade e a atividade celular sendo uma importante ferramenta para quantificação da formação de biofilme. Vários autores têm utilizado esses métodos para quantificar os níveis de atividade metabólica em biofilmes de *Candida spp.* Essa quantificação envolve a conversão do sal, pela enzima desidrogenase mitocondrial, a um produto solúvel em água (Formazan) que pode ser facilmente mensurado no sobrenadante celular (Tellier et al., 1992; Kuhn et al., 2003; Lal et al., 2008; Pierce et al., 2008).

Silva et al. (2009) avaliaram a habilidade de formação de biofilme sobre a superfície de poliestireno através do método de quantificação por meio de coloração com o cristal violeta. Para a análise, foram obtidas cepas de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* de diferentes sítios, como trato urinário, oral e vaginal e a cepa de referência *C. glabrata* ATCC2001. Os autores verificaram que todas as espécies de *Candida* estudadas formaram biofilme, porém os volumes da biomassa total das cepas de *C. glabrata* foram menores em comparação com as demais. Hawser; Douglas (1994) concluíram que os isolados de *C. albicans* formaram mais biofilme do que *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis* e *C. glabrata*. No presente trabalho não foi avaliado a formação de biofilme na superfície dos cones por isolados de diferentes espécies, mas foi possível verificar diferenças estatisticamente significativas nos biofilmes formados pelas cepas de *C. albicans*, após 24 horas de incubação, utilizando o teste do MTT.

Nossos resultados da avaliação da atividade metabólica das células do biofilme sobre os cones vaginais utilizando o método do MTT demonstram que quanto menor o tempo de incubação do material, maior é a atividade metabólica da maioria das células que estão aderidas. Porém, este comportamento não foi observado em todas as cepas estudadas. Quando realizado a comparação entre as espécies em função do tempo, foi observado que a atividade das células para *C. albicans* 4987, *C. albicans* 6974, incluindo a cepa de referência ATCC 90028, foi estatística significativa em 48 horas. Lal et al. (2008) investigaram a formação de biofilme de *C. albicans* recuperada de dispositivos intra-uterinos (DIU) por determinação colorimétrica do XTT. Foi demonstrado que, dos 15 isolados testados em diferentes períodos de tempo (8-72h), a formação máxima de biofilme foi alcançada apenas por um isolado após 48h.

Uppuluri et al. (2009) também quantificaram o biofilme formado por *C. albicans* SC5314 sobre a superfície de placas de poliestireno e de segmentos de cateter de silicone, através do ensaio com XTT. Além disso, foi utilizado o meio de cultura RPMI e urina artificial. Seus resultados revelaram que os biofilmes tiveram maior atividade metabólica em meio RPMI nas

primeiras 12 horas de formação do biofilme, enquanto as cultivadas em urina artificial, foram menos ativas. Entretanto, após 24 horas de incubação, a atividade metabólica do biofilme formado foi equivalente em ambos os meios. A presente pesquisa utilizou o meio de cultura RPMI tamponado com HEPES observando diferença estatisticamente significativa na atividade das células do biofilme de *C. albicans* 743, *C. albicans* 4990, *C. albicans* 5900 quando aderidas sobre a superfície dos cones no tempo de incubação de 24h e *C. albicans* 4987, *C. albicans* 6974 e *C. albicans* 743 em 48 horas.

Koch et al. (2013) observaram que após a formação prolongada de biofilmes durante 96 horas, são encontrados maiores níveis de *C. albicans* no substrato e sugerem que os materiais de base de dentadura influenciam na adesão de *Candida albicans* e sua proliferação. Segundo alguns autores, a formação de biofilme está relacionada com o tipo de biomaterial. A formação de biofilme em superfícies de implantes dentários de titânio foi altamente relacionada ao aumento da rugosidade da superfície (Souza et al., 2016). Neste sentido, vários trabalhos têm mostrado que os microrganismos se aderem mais facilmente em superfícies hidrofóbicas e apolares, tais como o poliestireno e outros materiais plásticos (Ramage et al., 2009).

Souza et al. (2016) investigou a formação de biofilmes orais sobre estruturas protéticas baseadas em ligas de Cromo-Cobalto (CoCr), porcelana à base de feldspato, titânio e zircônia. Os dados mostraram que a formação de biofilmes em superfícies de titânio apresentou menor taxa de crescimento nas primeiras 24h, embora tenha aumentado após 48h em comparação com os outros materiais. Os autores concluíram que o aumento do crescimento do biofilme em superfícies de implantes de titânio está altamente relacionada ao aumento da rugosidade da superfície. No entanto, as diferenças na densidade e na atividade de células viáveis não foram estatisticamente significativas.

Considerando a formação de biofilmes sobre o material dos cones vaginais, constituídos por um termoplástico, de superfície lisa e com diferentes cores, verificou-se um aumento de crescimento do biofilme por *C. albicans* principalmente após 24h de incubação, ainda que a característica de sua superfície seja considerada uma condição desfavorável para formação. Também obtivemos variações nos valores de biofilmes cultivados em cada cor dos segmentos de cones. Destacando-se uma maior densidade do biofilme formado por *Candida albicans* 5900 nos cones amarelo, vermelho e branco, após 24h.

Em conclusão, os biofilmes de *Candida albicans* foram produzidos em superfície abiótica dos segmentos de cone vaginal em diferentes períodos de tempo (24 e 48 horas). Dessa maneira estudos que avaliem a densidade e os aspectos morfológicos dos biofilmes entre outras espécies de *Candida* aderidos nos cones devem ser realizados. A presença dos biofilmes aderidos nos cones podem contribuir para uma maior resistência dessas espécies, assim como, aumentar o risco de infecções de pacientes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção das células fúngicas e preparo das suspensões

Foram utilizadas 7 isolados de leveduras do gênero *Candida* obtidas da coleção de culturas micoteca URM do departamento de micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco. As Cepas foram semeadas individualmente em placas de Petri (90x15 mm) contendo Ágar Sabouraud Dextrose e, em seguida, incubadas a uma temperatura de 37°C durante 24 horas. Após o crescimento das culturas, foram preparadas suspensões de células de levedura com concentração ajustada, em espectrofotômetro 530 nm, a 0,5% na escala de MacFarland em 3 ml de solução salina.

Preparação dos segmentos dos cones vaginais

Os cones vaginais, do Kit FemCone Quark Medical, foram previamente higienizados com água e detergente líquido neutro. Após serem enxaguados, foram seccionados em fragmentos de 1 cm de comprimento e transferidos para béquers contendo álcool 70% por 30 minutos. Em seguida, o álcool foi aspirado e adicionou-se água destilada para serem esterilizados em autoclave à uma temperatura de 121°C por 30 minutos. A confirmação da esterilização foi realizada incubando-se os fragmentos do cone em placas de Petri contendo Ágar Sabouraud Dextrose acrescido de 50 mg/mL de meio de cultura de cloranfenicol e mantidas à 37 °C por até 15 dias.

Avaliação da produção de biofilme

a) Determinação qualitativa do Biofilme

A avaliação qualitativa da capacidade de formação de biofilme foi realizada utilizando o método visual adaptado de Shin et al. (2002). Após semeio dos isolados em meio ágar Sabouraud e padronização das suspensões, 20µl foram inoculados em 180µl de Sabouraud líquido contido nos poços das microplacas, as quais foram mantidas a 35°C por 24h e 48h sem agitação. Em seguida, o conteúdo foi aspirado e os poços lavados com água destilada esterilizada e, sobre estes, adicionado o corante Fucsina (QEEL-Química Especializada Erich Ltda.) para realização de avaliação de acordo com a intensidade da coloração. A capacidade em corar foi avaliada visualmente e classificadas da seguinte forma: 1) Fortemente corado: quando o biofilme foi corado de forma intensa, possibilitando a correta determinação do contorno das áreas contendo biofilme; 2) Coloração mediana: quando o biofilme foi corado de forma mais fraca, mas ainda possibilitou a determinação do contorno das áreas com biofilme; 3) Fraca coloração: quando o biofilme não foi corado, impossibilitando a distinção da cor da placa e a cor característica do corante.

b) Determinação Quantitativa de Biofilme

Ensaio de placa de microtitulação: método de coloração cristal violeta (PFALLER et al., 1995; RUIZ et al., 2013)

De cada suspensão de *Candida albicans* preparadas e padronizadas em água salina, quantias de 20 µL foram transferidas para os poços das microplacas contendo 180 µL de Sabouraud líquido e incubadas a 37°C durante 24 e 48 horas. Após o tempo de incubação, as culturas foram cuidadosamente aspiradas e os poços lavados duas vezes com 200 µL de tampão PBS estéril. O poços pré-lavados foram corados com 110 µL de solução cristal violeta aquosa a 0,4% durante 45 min. Após esta etapa, foram realizadas três lavagens com 200 µL de água ultrapura (Milli-Q) estéril e o biofilme descolorido pela adição de 200 µL de etanol por 45 minutos. Ao final, 100 µL de cada poço foram transferidos para uma nova microplaca sendo a formação do biofilme avaliada através da diferença de densidade óptica entre o biofilme formado e o poço controle, pela leitura em espectrofotômetro ajustado com comprimento de onda de 595 nm. Cada linhagem foi testada oito vezes e os valores de absorvância do poço controle foram subtraídos aos dos poços teste para minimizar interferências. A quantificação da produção de biofilme foi realizada através da média aritmética da absorvância dos 8 testes.

Avaliação da capacidade de formação do biofilme na superfície dos cones vaginais (RAMAGE et al., 2002; KROM et al., 2006; PIERCE et al., 2008)

Para a fase de produção de biofilme na superfície dos cones, quantias de 100 µL de cada suspensão das cepas selecionadas, contendo 10^6 células/ml em RPMI tamponado com HEPES, foram transferidas para os poços das microplacas, contendo os fragmentos dos cones vaginais, e colocadas em incubadora refrigerada com agitação a 75 rpm, 37°C, durante 2 horas. Em seguida, os poços foram lavados três vezes com tampão fosfato (PBS), 200 µL do meio RPMI tamponado com HEPES foi adicionado e as placas incubadas durante 24 horas e 48 horas à 37°C para posterior avaliação. O isolado de *C. albicans* ATCC 90028 foi utilizado como controle.

A quantificação dos biofilmes foi realizada com o ensaio de redução de sal de 1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan (MTT- Sigma Chemical), onde 20 µL, na proporção de 5 µL para 1mL de tampão PBS, esterilizado por filtração em membrana (Millipore, poros de 0,22µm) foi adicionado à cada poço da placa de microtitulação e incubadas por 18 horas à 37°C. Após aspiração do corante, adicionou-se 200 µL de isopropanol durante 15 minutos. Ao final, 100 µL foi transferido do conteúdo de cada poço para uma nova placa de microtitulação afim de proceder à leitura em leitor de microplacas com 570 nm de comprimento de onda.

Após quantificação e identificação dos isolados com menor e maior capacidade de formação de biofilme, foi realizado um novo teste utilizando as cinco cores dos cones para cada linhagem com o objetivo de avaliar se a quantidade de biofilme sofre influência dos dispositivos coloridos.

Análise estatística

Para a análise estatística utilizou-se o Software R. 3.4.3. Os valores de absorbância, obtidos pelo método do Cristal violeta, para avaliação da habilidade de formação de biofilme entre as espécies, foram analisados por meio do teste ANOVA (On Way). O teste de comparações múltiplas (Tukey) foi utilizado, após a ANOVA, para comparação das médias encontradas, uma a uma.

A comparação das médias da atividade metabólica das células e biofilme formado sobre os cones vaginais entre espécies de *Candida albicans* também foram analisadas por meio do teste ANOVA e o teste de Tukey para comparação das médias, sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk. Os tratamentos foram comparados entre si através do teste t student (teste-T).

Para essas análises foi utilizado o software Microsoft Excel 2003 e o nível de significância adotado foi de 5% ou 0,05.

Material suplementar

A Figura 1 representa a análise qualitativa da formação de biofilme por *C. albicans* após 48 horas de incubação. A Figura 2 e 3 mostram os valores de absorbância do biofilme formado pelos isolados de *C. albicans*, durante 24 e 48 horas através do teste cristal violeta. A Figura 4 indica a atividade metabólica das células no biofilme formado na superfície dos cones vaginais durante 24 horas utilizando o método de redução de sal MTT. A Figura 5 demonstra os resultados da atividade de células viáveis de acordo com o tempo de maturação e cores dos cones. A Tabela 1 e 2 as espécies de *C. albicans* utilizadas e sua capacidade de formar biofilme. A Tabela 3 e 4 indica as diferenças significativas entre os isolados quanto a produção de biofilme. A Tabela 5 demonstra atividade metabólica das células em biofilme formado sobre os segmentos do cone vaginal, após 48 horas de incubação.

Agradecimentos

Este trabalho recebeu apoio do Projeto Universal- MCTI/CNPq (Nº 14/2014). Os autores não declaram interesses financeiros concorrentes. Agradecemos a Micoteca URM, do departamento de Micologia, Centro de Biociências da UFPE, pelo suporte com as coleções de culturas com certificação. Oferecemos nossos agradecimentos a Ewerton Pereira de Oliveira pela análise dos dados estatísticos.

Contribuições do autor: V. Pontes, R. Neves, projetaram a pesquisa. V. Pontes, M. Moura, P. Lima, F. A. Santos, M. D. Buonafina, realizaram os experimentos. V. Pontes, M. Moura, P. Lima, descreveram os dados analisados. V. Pontes, M. Moura, P. Lima, R. Neves contribuíram para preparação do manuscrito. V. Pontes escreveu o manuscrito.

REFERÊNCIAS

- Abrams, P., Cardozo L, Fall M., Griffiths D., Rosier P., Ulmsten U., Van Kerrebroeck P., Victor, A. and Wein A. (2003), "The standardisation of terminology in lower urinary tract function: Report from the standardisation sub-committee of the International Continence Society", *Urology*, Vol. 61, pp. 37–49.
- Amaro, J. L. Macharelli, C. A., Yamamoto, H., Kawano, P. R., Padovani, C. R. and Agostinho, A. D. (2009), "Prevalence and Risk Factors for Urinary and Fecal Incontinence in Brazilian Women", *Int Braz J Urol*, Vol. 35, pp. 592-8.
- Auler, et al. (2010), "Biofilm formation on intrauterine devices in patients with recurrent vulvovaginal candidiasis", *Medical Mycology*, Vol. 48, No. 1, pp. 211–216.
- Berquó, M. S., Ribeiro, M. O. and Amaral, R. G. (2009), "Fisioterapia no tratamento da incontinência urinária feminina" *Femina*, Vol. 37, No. 7, pp. 385–388.
- Blankenship, J. R. and Mitchell, A. P. (2006), "How to build a biofilm: a fungal perspective", *Current Opinion in Microbiology*, Vol. 9, No. 6, pp. 588–594.
- Brubaker, L. and Wolfe, A. J. (2015), "The new world of the urinary microbiota in women", *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, Vol. 213, No. 5, pp. 644–649.
- Carvalho, et al. (2014), "O impacto da Incontinência Urinária e seus Fatores Associados em idosas", *Rev. Bras. Geriatr. Gerontol*, Vol. 17, No. 4, pp. 721-730.
- Chandra, J. et al. (2001), "Genetic Control of Candida Albicans Biofilm Development", *National Review of Microbiology*, Vol. 9, No. 18, pp. 109–118.
- Chandra, J., Mukherjee, P.K. and Ghannoum, M.A. (2008), "In vitro growth and analysis of Candida biofilms", *Nature Protocols*, Vol. 3, No. 12, pp. 1909-1924.
- Coyne, K. S. et al. (2013), "Comorbidities and personal burden of urgency urinary incontinence: A systematic review", *International Journal of Clinical Practice*, Vol. 67, No. 10, pp. 1015–1033.
- Cuéllar-Cruz, M. et al. (2012), "The effect of biomaterials and antifungals on biofilm formation by Candida species: A review", *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, Vol. 31, No. 10, pp. 2513–2527.
- Estivill, D. et al. (2011), "Biofilm formation by five species of Candida on three clinical materials", *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 86, No. 2, pp. 238–242.
- Gasparetto, A. et al. (2005). "Produção de biofilme por leveduras isoladas de cavidade bucal de usuários de prótese dentária", *Acta Scientiarum. Health Sciences*, Vol. 27, No. 1, pp. 37-40.
- Greer, J.A., Smith, A.L. and Arya, L.A. (2012), "Pelvic floor muscle training for urgency urinary incontinence in women: a systematic review", *Int Urogynecol J.*, Vol. 23, No. 6, pp. 687-97.
- Harriott, M. M. et al. (2010), "Candida albicans forms biofilms on the vaginal mucosa", *Microbiology*, Vol.156, No. 12, pp. 3635–3644.

- Hawser, S.P. and Douglas, L.J. (1994), "Biofilm formation of *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro", *Infect Immun*, Vol. 62, pp. 915-921.
- Heydari, F., Motaghed, Z. and Abbaszadeh, F. (2016), "Could Urinary Tract Infection Cause Female Stress Urinary Incontinence? A Clinical Study", *Nephro-Urology Monthly*, Vol. 8, No. 1, pp. 1-4.
- Jabra-Rizk, M. A., Falkler, W. A. and Meiller, T. F. (2004), "Fungal Biofilms and Drug Resistance", *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 10, No. 1, pp. 14-19.
- Khandelwal, C. and Kistler, C. (2013), "Diagnosis of Urinary Incontinence", *American Family Physician*, Vol. 87, No. 8, pp. 543-50.
- Koch, C., Bürgers, R. and Hahnel, S. (2013), "Candida albicans adherence and proliferation on the surface of denture base materials", *Gerodontology*, Vol. 30, No. 4, pp. 309-13.
- Krom, B. P., Cohen, J. B., Feser, G. E. M. and Cihlar, R. L. (2007). "Optimized candidal biofilm microtiter assay", *J. Microbiol. Methods*, Vol. 68, pp. 421-423.
- Kuhn, D. M. et al. (2002), "Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces", *Infection and Immunity*, Vol. 70, pp. 878-888.
- Lal, P. et al. (2008), "Biofilm formation by *Candida albicans* isolated from intrauterine devices", *Indian J Microbiol*, Vol. 48, No. 4, pp. 438-44.
- Lohse, M.B., Gulati, M., Johnson, A.D. and Nobile, C.J. (2018), "Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms", *Nat Rev Microbiol*, Vol. 16, pp. 19-3.
- Maclachlan, L. S. and Rovner, E. S. (2015), "New Treatments for Incontinence", *Advances in Chronic Kidney Disease*, Vol. 22, No. 4, pp. 279-288.
- Matheus, L. M., Mazzari, C.F. and Mesquita R. A. (2006), "Influencia dos exercícios perineais e dos cones vaginais, associados à correção postural, no tratamento da incontinência urinária feminina", *Rev Bras Fisioter*, Vol. 10, pp. 387-92.
- Mayer, F.L., Wilson, D. and Hube, B. (2013), "*Candida albicans* pathogenicity mechanisms", *Virulence*, Vol. 4, nO. 2, pp. 119-128.
- Mota, Renato Lains. (2017), "Female urinary incontinence and sexuality", *Int. braz j urol*. Vol. 43, pp. 20-28.
- Mukherjee, P. K. and Chandra, J. (2004), "*Candida* biofilm resistance", *Drug Resistance Updates*, Vol. 7, No. 4-5, pp. 301-309.
- Nojavan, F., Sharifi, H., Dabbaghian, F.H., Ghanbari, Z., Kamalinejad, M., Mokaberinejad, R. and Emami, M. (2015), "Causes and Risk Factors of Urinary Incontinence: Avicenna's Point of View vs. Contemporary Findings", *Medical History Journal*, Vol. 12, No. 1, pp. 1995- 1998.
- Oblasser, C., Christie, J. and Mccourt, C. (2015), "Vaginal cones or balls to improve pelvic floor muscle performance and urinary continence in women postpartum: A quantitative systematic review and meta-analysis protocol", *Journal of Advanced Nursing*, Vol. 71, No. 4, pp. 933-941.
- Oliveira, et al. (2010), "Avaliação dos fatores relacionados à ocorrência da incontinência urinária feminina", *Rev. Assoc. Med. Bras*, Vol. 56, No. 6, pp. 688-690.
- Pearce, M. M., Hilt, E. E. and Rosenfeld, A. B. (2014), "The Female Urinary Microbiome : a Comparison of Women with and without Urgency Urinary Incontinence", Vol. 5, No. 4, pp. 1-12.
- Peattie, A. B., Plevnik, S. and Stanton, S. L. (1988), "Vaginal cones: a conservative method of treating genuine stress incontinence", *British journal of obstetrics and gynaecology*, Vol. 95, No. 10, p.. 1049-1053.

- Pierce, C. G., Uppuluri, P., Tristan, A. R., Wormley Jr, F. I., Mowat, E., Ramage, G. and Lopez-Ribot, J. L. A. (2008), "Simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing" *Nature Protocol*, Vol. 3, p. 1494-1500.
- Pierce, C.G. et al. (2017), "The *Candida albicans* Biofilm Matrix: Composition, Structure and Function", *J. Fungi*, 3, 14.
- Ramage, G. et al. (2005), "Candida biofilms: an update", *Eukaryotic Cell*, Vol. 4, No. 4, p. 633-638.
- Ramage, G., Bachmann, S., Patterson, T. F., Wickes, B. L. and Lopez Ribot, J. L. (2002), "Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms", *J. Antimicrob. Chemother*, Vol. 4, pp. 973-980.
- Rodhe, N., Englund, L., Molstad S. and Samuelsson, E. (2008), "Bacteriuria is associated with urge urinary incontinence in older women", *Scand J Prim Health Care*, Vol. 26, No. 1, pp. 35-39.
- Santos, C.R.S. and Santos, V.L.C.G. (2010), "Prevalência da incontinência urinária em amostra randomizada da população urbana de Pouso Alegre, Minas Gerais, Brasil", *Rev Latinoam Enferm*, Vol. 18, No. 5, pp. 903-10.
- Sardi, J. D. C. O. et al. (2014), "Highlights in pathogenic fungal biofilms", *Revista Iberoamericana de Micologia*, Vol. 31, No. 1, pp. 22-29.
- Seo, J. T., Yoon, H. and Kim, Y. H. (2004), "A randomized prospective study comparing new vaginal cone and FES-Biofeedback", *Yonsei Medical Journal*, Vol. 45, No. 5, pp. 879-84.
- Shin, J. H. et al. (2002), "Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources", *J Clin Microbiol*, Vol. 40, No. 4, pp. 1244-8.
- Silva, A. M. N. and Oliva, L. M. P. (2011), "Exercícios de Kegel associados ao uso de cones vaginais no tratamento da incontinência urinária: estudo de caso", *Scientia Medica*, Vol. 21, No. 4, pp. 173-176.
- Silva, S. et al. (2009), "Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition", *Medical mycology*, Vol. 47, No. 7, pp. 681-689.
- Silva, V.A. and D'Elboux, MJ. (2012), "Fatores associados a incontinência urinária em idosos com critério de fragilidade", *Texto Contexto Enferm*, Vol. 21, No. 2, pp. 338-347.
- Singh, et al. (2015), "Pelvic floor muscle training for female urinary incontinence: Does it work?", *Archives of Gynecology and Obstetrics*, Vol. 293, No. 6, pp. 1-7.
- Souza, J.C., Mota, R. R. Sordi, M.B., Passoni, B.B., Benfatti, C. A. and Magini, R. S. (2016), "Biofilm Formation on Different Materials Used in Oral Rehabilitation", *Braz Dent J*, Vol. 27, No. 2, pp. 141-7.
- Subramaniam, J. (2016), "Association of Urinary Tract Infection in Married Women Presenting with Urinary Incontinence in a Hospital based Population", *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, Vol. 10, N. 3, pp. 10-13.
- Sumardi, et al. (2014), "Prevalence of Urinary Incontinence , Risk Factors and Its Impact: Multivariate Analysis from Indonesian Nationwide Survey", *The Indonesian Journal of Internal Medicine*, Vol. 46, N. 3, pp. 175-182.
- Tamanini, J. T. N., Lebrão, M. L., Duarte Y. A. O., Santos L. F. and Laurenti, R. (2009), "Analysis of the prevalence of and factors associated with urinary incontinence among elderly people in the Municipality of São Paulo, Brazil: SABE Study (Health, Wellbeing and Aging)", *Cad. Saúde Pública*, Vol. 25, N. 8, pp.1756-1762.
- Tammer, I., Reuner, J., Hartig, R. and Geginat, G. (2014), "Induction of *Candida albicans* biofilm formation on silver-coated vascular grafts", *J Antimicrob Chemother*, Vol. 69, pp. 1282-1285.

- Tellier R, Krajden M, Grigoriew G A and Campbell I. (1992), "Innovative endpoint determination system for antifungal susceptibility testing of yeasts", *Antimicrob Agents Chemother*, Vol. 36, pp. 1619–1625.
- Tosun, O. C., Solmaz, U. E., Atalay, T., Gokhan, G., Cenk, E., Ahmet, M., Yeniel, A. O., Mat, E., Malkoc, M. and ASKAR, N. (2016), "Assessment of the effect of pelvic floor exercises on pelvic floor muscle strength using ultrasonography in patients with urinary incontinence: a prospective randomized controlled trial", *The Journal of Physical Therapy Science*, Vol. 28, pp. 360–365.
- Uppuluri, P. et al. (2009), "Characteristics of *Candida albicans* Biofilms Grown in a Synthetic Urine Medium", *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 47, pp. 4078 – 4083.
- Witkin, S. S., Linhares, I. M. and Giraldo, P. (2007), "Bacterial flora of the female genital tract: function and immune regulation", Best practice & research. *Clinical obstetrics & gynaecology*, Vol. 21, No. 3, pp. 347–54.
- Zhou, X. et al. (2004), "Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods", *Microbiology*, Vol. 150, No. 8, pp. 2565–2573.

6 CONCLUSÕES

As cepas de *Candida albicans* (*Candida albicans* 743, *Candida albicans* 4986, *Candida albicans* 4987, *Candida albicans* 4990, *Candida albicans* 5900, *Candida albicans* 5974 e cepa de referência ATCC90028) produziram biofilmes na superfície abiótica dos cones vaginais nos diferentes períodos de tempo estudados (24 e 48 horas).

Os isolados apresentaram comportamento diferentes quanto a capacidade de formação de biofilme após 24h e 48h de incubação. Em 24 horas, cinco (71,42%) isolados demonstraram atividade de formação fraca e um (14,28%) forte atividade. Comparando com a avaliação após 48 horas, quatro (57,14%) revelaram atividade de formação moderada.

Na avaliação quantitativa, por meio do teste com o cristal violeta, *C. albicans* 743 formou maior biofilme, que foi estatisticamente maior quando comparados com as demais espécies, incluindo a cepa de referência ATCC 90028. Houve diferença estatisticamente significativa nas médias dos isolados em ambos os tempos de formação do biofilme avaliados ($p < 0,05$). A comparação entre as médias de aderência e formação do biofilme formados pelos isolados, mostrou diferença significativas nos dois intervalos de tempo, onde a cepa *C. albicans* 743 foi a que obteve maior destaque.

A atividade metabólica das células no biofilme formado sobre os cones vaginais, mensurada pelo teste do MTT, foi em média 1.74 ± 0.39 para *C. albicans* 4990 e 2.06 ± 0.41 para *C. albicans* 5900. Após 48 horas, *C. albicans* 4987, *C. albicans* 6974 mostraram médias mais significativas. *C. albicans* 743 apresentou diferença estatística significativa em ambos os períodos de formação do biofilme.

Na interação corbiomaterial/tempo a atividade celular das 3 cepas testadas, houve maior atividade de *Candida albicans* 5900 nas primeiras 24h nos cones de cor amarela, vermelha e

branca. Entretanto, *Candida albicans* 743 e *Candida albicans* 4986 a atividade celular foi maior após 48h em todas as cores dos cones.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do exposto, consideramos que a pesquisa sobre biofilmes de *Candida albicans* na superfície dos segmentos de cone vaginal apresentou resultados satisfatórios. O desenvolvimento de ensaios *in vitro* para identificação das diferentes fases de formação do biofilme formados por *C. albicans* em biomateriais tem se demonstrado confiáveis e altamente reproduzíveis. Estudos mais aprofundados, que avaliem a densidade e os aspectos morfológicos dos biofilmes entre outras espécies de *Candida* e os fatores que regulam a formação do biofilme nos cones vaginais devem ser realizados. A presença dos biofilmes aderidos nos cones podem contribuir para uma maior resistência dessas espécies, assim como, aumentar o risco de infecções relacionadas ao seu uso. Dessa forma, será possível elaborar estratégias mais eficientes para prevenir as infecções relacionadas ao biofilme e suas repercussões clínicas.

REFERÊNCIAS

- ABRAMS, P. et al. The standardisation of terminology in lower urinary tract function: Report from the standardisation sub-committee of the International Continence Society. **Urology**, v. 61, n. 1, p. 37–49, 2003.
- AMARO, J. L.; MACHARELLI, C. A.; YAMAMOTO, H.; KAWANO, P. R.; PADOVANI, C. R.; AGOSTINHO, A. D. Prevalence and Risk Factors for Urinary and Fecal Incontinence in Brazilian Women. **International Brazilian Journal of Urology**, v. 35, p. 592-8, 2009.
- APARNA, M. S.; YADAV, S. Biofilms: microbes and disease. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 526–530, 2008.
- ARIANI, N. et al. Microbial biofilms on facial prostheses. **Biofouling**, v. 28, n. 6, p. 583–591, 2012.
- AULER, et al. Biofilm formation on intrauterine devices in patients with recurrent vulvovaginal candidiasis. **Medical Mycology**, v. 48, n. 1, p. 211–216, 2010.
- BARENTSEN, J.A.; VISSER, E.; HOFSTETTER, H.; MARIS, A.M.; DEKKER, J.H.; DE BOCK, G.H. Severity, not type, is the main predictor of decreased quality of life in elderly women with urinary incontinence: a population-based study as part of a randomized controlled trial in primary care. **Health Quality of Life Outcomes**, v.18, n. 10, p.153, 2012.
- BEHZADI et al. Urinary Tract Infections Associated with *Candida albicans*. **Maedica**, v. 5, n. 4, p. 277–279, 2010.
- BELO, J.; FRANCISCO, E.; LEITE, H., CATARINO, A. Reeducação do pavimento pélvico com cones de plevnik em mulheres com incontinência urinária. **Acta Médica Portuguesa**, v. 18, p. 117-122, 2005.
- BERMAN, J.; SUDBERY P.E. *Candida albicans*: A molecular revolution built on lessons from budding yeast. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, p. 918–930, 2002.
- BERQUÓ, M. S.; RIBEIRO, M. O.; AMARAL, R. G. Fisioterapia no tratamento da incontinência urinária feminina. **Femina**, v. 37, n. 7, p. 385–388, 2009.
- BLANKENSHIP, J. R.; MITCHELL, A. P. How to build a biofilm: a fungal perspective. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 588–594, 2006.
- BO, K. Vaginal weight cones. Theoretical framework, effect on pelvic floor muscle strength and female stress urinary incontinence. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v. 74, n. 14, p. 87-92, 1995.
- BORIS, S.; BARBÉS, C. Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 5, p. 543–546, 2000.
- BRADFORD L. L.; CHIBUCOS M. C.; MA B.; BRUNO V.; RAVEL J. Vaginal *Candida*

spp. genomes from women with vulvovaginal candidiasis. *Pathogens and Disease*, v. 75, n. 6, 2017.

BRUBAKER, L. et al. Urinary bacteria in adult women with urgency urinary incontinence. **International Urogynecology Journal**, v. 25, n. 9, p. 1179–1184, 2014.

BRUBAKER, L.; WOLFE, A. J. The new world of the urinary microbiota in women. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 213, n. 5, p. 644–649, 2015.

BUSSCHER, H.J.; JAGER, D.; FINGER, G.; SCHAEFER N.; VAN DER MEI H.C. Energy transfer, volumetric expansion, and removal of oral biofilms by non-contact brushing. **European Journal of Oral Sciences**, v.118, p. 177-182, 2010.

CAMMU, H.; VAN NYLEN, M. Pelvic floor exercises versus vaginal weight cones in genuine stress incontinence. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v. 77, n. 1, p. 89–93, 1998.

CARVALHO, et al. O impacto da Incontinência Urinária e seus Fatores **Associados em** idosos. *Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia*, v. 17, n. 4, p. 721-730, 2014.

CASTRO, R.; OLIVEIRA, E. Fisioterapia e incontinencia urinária de esforço: revisao e análise crítica. **Femina**, v. 36, n. 12, p. 737-742, 2008.

CELIK TOSUN, O. et al. Assessment of the effect of pelvic floor exercises on pelvic floor muscle strength using ultrasonography in patients with urinary incontinence: a prospective randomized controlled trial. **Journal of Physical Therapy Science**, v. 28, n. 2, p. 360–5, 2016.

CHAFFIN, W.L. et al. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 130-80, 1998.

CHANDRA, J. et al. Genetic Control of Candida Albicans Biofilm Development. **National Review of Microbiology**, v. 9, n. 18, p. 109–118, 2001.

COSTA, A. P.; SANTO, F. D. R. P. Abordagem da fisioterapia no tratamento da incontinência urinaria de esforço : revisão da literatura. **Femina**, v. 40, n. 2, p. 0–3, 2012.

COYNE, K. S. et al. Comorbidities and personal burden of urgency urinary incontinence: A systematic review. **International Journal of Clinical Practice**, v. 67, n. 10, p. 1015–1033, 2013.

CRIBBY, S.; TAYLOR, M.; REID, G. Vaginal microbiota and the use of probiotics. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, v. 2008, p. 1-8, 2008.

CUÉLLAR-CRUZ, M. et al. The effect of biomaterials and antifungals on biofilm formation by Candida species: A review. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, n. 10, p. 2513–2527, 2012.

DOUGLAS, L. J. Candida biofilms and their role in infection. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 30–36, 2003.

ESTIVILL, D. et al. Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials. **Journal of Microbiological Methods**, v. 86, n. 2, p. 238–242, 2011.

GALLE, L. C.; GIANINNI, M. J. S. M. Prevalência e susceptibilidade de leveduras vaginais. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 4, p. 229–236, 2004.

GAMEIRO, M. O. et al. Vaginal weight cone versus assisted pelvic floor muscle training in the treatment of female urinary incontinence. A prospective, single-blind, randomized trial. **International Urogynecology Journal**, v. 21, n. 4, p. 395–9, 2010.

GANGULY, S.; MITCHELL, A. P. Mucosal biofilms of *Candida albicans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 380–385, 2011.

GASPARETTO, A. et al. Produção de biofilme por leveduras isoladas de cavidade bucal de usuários de prótese dentária. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 27, n. 1, p. 37–40, 2005.

GHADERI, F.; OSKOU EI, A. E. Physiotherapy for women with stress urinary incontinence: a review article. **Journal of physical therapy science**, v. 26, n. 9, p. 1493–9, 2014.

GOLMAKANI, N. et al. Behavioral intervention program versus vaginal cones on stress urinary incontinence and related Quality of Life: A randomized clinical trial. **Oman Medical Journal**, v. 29, n. 1, p. 32–38, 2014.

Greer, J.A.; Smith, A.L.; Arya, L.A. Pelvic floor muscle training for urgency urinary incontinence in women: a systematic review. **International Urogynecology Journal**, v. 23, n. 6, p. 687–97, 2012.

GULATI, M.; ENNIS C. L.; RODRIGUEZ D. L.; NOBILE, C. J. Visualization of Biofilm Formation in *Candida albicans* Using an Automated Microfluidic Device. **Journal of Visualized Experiments**, v. 14, n. 130, p. 1–16, 2017.

HADDAD, J. M. et al. Vaginal cone use in passive and active phases in patients with stress urinary incontinence. **Clinics**, v. 66, n. 5, p. 785–791, 2011.

HARRIOTT, M. M. et al. *Candida albicans* forms biofilms on the vaginal mucosa. **Microbiology**, v. 156, n. 12, p. 3635–3644, 2010.

HAWSER, S.P.; DOUGLAS, L.J. Biofilm formation of *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 915–921, 1994.

HERBISON, P.; PLEVNIK, S.; MANTLE J. Weighted vaginal cones for urinary incontinence. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 8, n. 7, 2002.

HEYDARI, F.; MOTAGHED, Z.; ABBASZADEH, F. Could Urinary Tract Infection

Cause Female Stress Urinary Incontinence? A Clinical Study. **Nephro-Urology Monthly**, v. 8, n. 1, p. 1–4, 2016.

IRWIN, D.E.; KOPP, Z.S.; AGATEP, B.; MILSOM, I., ABRAMS, P. Worldwide prevalence estimates of lower urinary tract symptoms, overactive bladder, urinary incontinence and bladder outlet obstruction. **BJU International**, v. 108, n. 7, p. 1132–1138, 2011.

JABRA-RIZK, M. A.; FALKLER, W. A.; MEILLER, T. F. Fungal Biofilms and Drug Resistance. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, p. 14–19, 2004.

JUSTINA, L.B.D. Prevalência de incontinência urinária feminina no Brasil: uma revisão sistemática. **Revista Inspirar**. v.24, n. 3, p. 7-13, 2013.

KHANDELWAL, C.; KISTLER, C. Diagnosis of Urinary Incontinence. **American Family Physician**, v. 87, n. 8, p. 543-50, 2013.

KOCH, C.; BÜRGERS, R.; HAHNEL, S. Candida albicans adherence and proliferation on the surface of denture base materials. **Gerodontology**, v. 30, n. 4, p. 309–313, 2013.

KONDO, A.; YAMADA, Y.; NIJIMA R. Treatment of stress incontinence by vaginal cones: short- and long-term results and predictive parameters. **British Journal of Urology**, v. 76, p. 464-6, 1995.

KUHN, D. M. et al. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. **Infection and Immunity**. v. 70, p. 878–888, 2002.

LAL, P. et al. Biofilm formation by Candida albicans isolated from intrauterine devices. **Indian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 438-44, 2008.

LINHARES, I. M.; GIRALDO, P. C.; BARACAT, E. C. Novos conhecimentos sobre a flora bacteriana vaginal. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 3, p. 370–374, 2010.

LOUREIRO, L. S. N. et al. Incontinência urinária em mulheres idosas: determinantes, consequências e diagnósticos de enfermagem. **Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste**, v. 12, n. 2, p. 417-23, 2011.

MACLACHLAN, L. S.; ROVNER, E. S. New Treatments for Incontinence. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 22, n. 4, p. 279–288, 2015.

MATHEUS, L. M., MAZZARI, C.F., MESQUITA R. A. Influencia dos exercícios perineais e dos cones vaginais, associados à correção postural, no tratamento da incontinência urinaria feminina. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 10, p. 387-92, 2006.

MAYER, F.L., WILSON, D., HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119–128, 2013.

MELO L. S. et al. Infecção do trato urinário: uma coorte de idosos com incontinência urinária. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 70, n. 4, p. 873-80, 2017.

MOTA, RENATO LAINS. Female urinary incontinence and sexuality. **International Brazilian Journal Of Urology**, v. 43, p. 20-28, 2017.

MUKHERJEE, P. K.; CHANDRA, J. Candida biofilm resistance. **Drug Resistance Updates**, v. 7, n. 4-5, p. 301–309, 2004.

NETT, et al. Rat Indwelling Urinary Catheter Model of *Candida albicans* Biofilm Infection. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 12, p. :4931-40, 2014.

NIKAWA, H.; NISHIMURA, H.; YAMAMOTO, T.; HAMADA, T.; SAMARANAYAKES, L. P. The Role of Saliva and Serum in *Candida albicans* Biofilm Formation on Denture Acrylic Surfaces. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v.9, p. 3548, 1996.

NOBILE, C. J.; SCHNEIDER, H. A.; NETT, J. E.; SHEPPARD, D. C.; FILLER, S. G.; ANDES, D. R.; MITCHELL, A. P. Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. **Current Biology**, v. 18, n. 14, p. 1017–1024, 2008.

NOJAVAN, F.; SHARIFI, H.; DABBAGHIAN, F.H.; GHANBARI, Z.; KAMALINEJAD, M.; MOKABERINEJAD, R.; EMAMI, M. Causes and Risk Factors of Urinary Incontinence: Avicenna's Point of View vs. Contemporary Findings. **Medical History Journal**, v. 12, n. 1, p. 1995- 1998, 2015.

NYSTROM, E. et al. ICIQ symptom and quality of life instruments measure clinically relevant improvements in women with stress urinary incontinence. **Neurology and urodynamics**, v. 34, p. 747-751, 2015.

OBLASSER, C.; CHRISTIE, J.; MCCOURT, C. Vaginal cones or balls to improve pelvic floor muscle performance and urinary continence in women postpartum: A quantitative systematic review and meta-analysis protocol. **Journal of Advanced Nursing**, v. 71, n. 4, p. 933–941, 2015.

OLIVEIRA, et al. Avaliação dos fatores relacionados à ocorrência da incontinência urinária feminina. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 6, p. 688-690, 2010.

PATHAK, A.; SHARMA, S.; SHRIVASTVA P. Multi-species biofilm of *Candida albicans* and non-*Candida albicans* *Candida* species on acrylic substrate. **Journal of Applied Oral Science**, v. 20, n. 1, p. :70-75, 2012.

PEATIE, A. B.; PLEVNIK, S.; STANTON, S. L. Vaginal cones: a conservative method of treating genuine stress incontinence. **British journal of obstetrics and gynaecology**, v. 95, n. 10, p. 1049–1053, 1988.

PEREIRA, V. S. et al. Vaginal cone for postmenopausal women with stress urinary incontinence : randomized , controlled trial. **Climateric**, p. 45–51, 2012.

PIERCE, C. G.; UPPULURI, P.; TRISTAN, A. R.; WORMLEY JR, F. I.; MOWAT, E.; RAMAGE, G.; LOPEZ-RIBOT, J. L. A. Simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nature Protocols**, v. 3, p. 1494-1500, 2008.

PIERCE, C.G. et al. The *Candida albicans* Biofilm Matrix: Composition, Structure and Function. **J. Fungi**. v. 3, n. 14, 2017.

PYBUS, V.; ONDERDONK, A. B. Microbial interactions in the vaginal ecosystem, with emphasis on the pathogenesis of bacterial vaginosis. **Microbes and Infection**, v. 1, n.4, p. 285-292, 1999.

RAMAGE, G. et al. *Candida biofilms*: an update. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 4, p. 633-638, 2005.

RAMAGE, G.; BACHMANN, S.; PATTERSON, T. F.; WICKES, B. L.; LOPEZ RIBOT, J. L. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 4, p. 973-980, 2002.

RODHE, N.; ENGLUND, L.; MOLSTAD S.; SAMUELSSON, E. Bacteriuria is associated with urge urinary incontinence in older women. **Scandinavian Journal of Primary Health Care**, v. 26, n.1, p. 35-39, 2008.

SANTOS, C.R.S.; SANTOS, V.L.C.G. Prevalência da incontinência urinária em amostra randomizada da população urbana de Pouso Alegre, Minas Gerais, Brasil. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 18, n. 5, p. 903-10, 2010.

SANTOS, P. F. D. et al. Electrical stimulation of the pelvic floor versus vaginal cone therapy for the treatment of stress urinary incontinence. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 31, n. 9, p. 447-452, 2009.

SARDI, J. D. C. O. et al. Highlights in pathogenic fungal biofilms. *Revista Iberoamericana de Micologia*, v. 31, n. 1, p. 22-29, 2014.

SEO, J. T.; YOON, H.; KIM, Y. H. A randomized prospective study comparing new vaginal cone and FES-Biofeedback. **Yonsei Medical Journal**, v. 45, n. 5, p. 879, 84, 2004.

SILVA, A. M. N.; OLIVA, L. M. P. Exercícios de Kegel associados ao uso de cones vaginais no tratamento da incontinência urinária: estudo de caso. **Scientia medica**, v. 21, n. 4, p. 173-176, 2011.

SILVA, S. et al. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. **Medical mycology**, v. 47, n. 7, p. 681-9, 2009.

SILVA, V.A.; D'ELBOUX, MJ. Fatores associados a incontinência urinária em idosos com critério de fragilidade. **Texto e Contexto Enfermagem**, v. 21, n. 2, p. 338-347, 2012.

SINGH, N. et al. Pelvic floor muscle training for female urinary incontinence: Does it work? **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 293, n. 6, p. 1–7, 2015.

SOUZA, J.C.; MOTA, R. R.; SORDI, M. B.; PASSONI, B.B.; BENFATTI, C.; MAGINI, R. S. Biofilm Formation on Different Materials Used in Oral Rehabilitation. **Brazilian Dental Journal**, v. 27, n. 2, p. 141-7, 2016.

STICKLER, D. J. et al. Biofilms on indwelling urethral catheters produce quorum sensing signal molecules in situ and in vitro. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 9, p. 3486–3490, 1998.

SUBAK, L. L. et al. The “Costs” of Urinary Incontinence for Women. **Obstetrics and Gynecology**, v. 107, n. 4, p. 908–916, 2006.

SUBRAMANIAM, J. Association of Urinary Tract Infection in Married Women Presenting with Urinary Incontinence in a Hospital based Population. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, n. 3, p. 10–13, 2016.

SUMARDI, R. et al. Prevalence of Urinary Incontinence , Risk Factors and Its Impact : Multivariate Analysis from Indonesian Nationwide Survey. **The Indonesian Journal of Internal Medicine**, v. 46, n. 3, p. 175–182, 2014.

TAFF. Mechanisms of Candidabiofilm drug resistance Access. v. 8, n. 10, p. 1–19, 2014.

TAMANINI, J. T. N.; LEBRÃO, M. L.; DUARTE, Y. A. O.; SANTOS, L. F.; LAURENTI, R. Analysis of the prevalence of and factors associated with urinary incontinence among elderly people in the Municipality of São Paulo, Brazil: SABC Study (Health, Wellbeing and Aging). *Caderno de Saúde Pública*, v. 25, n. 8, p. 1756-1762, 2009.

TELLIER, R.; KRAJDEN, M.; GRIGORIEW, G. A.; CAMPBELL, I. Innovative endpoint determination system for antifungal susceptibility testing of yeasts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, p. 1619–1625, 1992.

TOMCZA, K.; SZALEK, E.; GRZEŚKOWIAK, E. The problems of urinary tract infections with *Candida* spp. etiology in women. **Postępy Higieny i Medycyny Doswiadczałnej**, v. 29, n. 68, p. 1036-9, 2014.

TOULET, D.; DEBARRE, C.; IMBERT, C. Could liposomal amphotericin B (L-AMB) lock solutions be useful to inhibit *Candida* spp. biofilms on silicone biomaterials? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 2, p. 430–432, 2012.

UPPULURI, P.; PIERCE, C. G.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. *Candida albicans* Biofilm Formation of its Clinical Consequences. **Future Microbiology**, v. 4, p. 1235–1237, 2009.

WITKIN, S. S.; LINHARES, I. M.; GIRALDO, P. Bacterial flora of the female genital tract: function and immune regulation. **Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology**, v. 21, n. 3, p. 347–54, 2007.

ZHOU, X. et al. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy

women using cultivation-independent methods. **Microbiology**, v. 150, n. 8, p. 2565–2573, 2004.

ZIARRUSTA, G.B. Vulvovaginitis candidiásica. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 19, p. 22-4, 2002.

ANEXOS

Anexo A – ARTIGO DE REVISÃO

Short Communication

Experimental Pathology and Health Sciences
2016;8 (3): 45-46

Effects of vaginal cones in the treatment of female urinary incontinence: literature review

Ponte, V.M.B¹, Moura, M.R.A¹, Machado, P.C.R¹, Rocha, A.P.S¹, Santos, F.A.G¹, Neves, R.P¹

¹ – Department of Pathology, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

Abstract

Introduction: Vaginal cones is a preferred method for treating incontinent women and is a simple and practical way to identify and strengthen the pelvic muscles. Its use induces contraction of the muscles and helps in restoring strength and continence mechanism. **Objective:** To review the literature on effective use of vaginal cones in the treatment of female urinary incontinence. **Methods:** The study was the kind of review, exploratory and descriptive, on the use of vaginal cones for the treatment of female urinary incontinence, with primary sources indexed in the Bireme portal databases (LILACS and SciELO) and PubMed/ MedLine. **Results:** We selected 165 articles in Pubmed portal, 21 in Bireme portal and 80 in the periodic capes. After appreciate 266 articles and analysis of references of selected articles, only 11 studies were included in the survey. The studies addressed the treatment using only the vaginal cones or comparing it with perineal exercises, electrical stimulation or no treatment. **Conclusions:** The use of vaginal cones, associated with pelvic floor exercises, showed positive results in terms of decreased urine incontinence, improved muscle strength and quality of incontinentes women.

Keywords: Vaginal Cones; Urinary Incontinence; Physiotherapy.

Introduction

Urinary incontinence (UI) is defined by the International Continence Society (ICS) as the involuntary loss of urine being considered a social or hygienic nature of problem. (ABRAMS et al, 2003) Medically, urinary incontinence in women is divided into three main types: stress incontinence, urgency urinary incontinence and mixed urinary incontinence. It is known that the pathophysiology of UI is multifactorial, but the weakening of the pelvic floor muscles is a problem frequently encountered in these conditions. Since muscle dysfunction is an important pathogenetic factor of the UI, the conservative therapy with the use of perineal re-education, should focus to strengthen the sphincter components, improved transmission of intra-abdominal pressure, increased muscle tone and consequently the mechanism continence.

Vaginal cones are widely used in the treatment of incontinent women and represent a simple and practical way to identify and strengthen the pelvic floor muscles. When inserted into the vagina, can stimulate learning of contraction of the pelvic floor muscles by retaining cones with increasing weights. Thus, reflex contractions or voluntary muscles to prevent the sliding of the cone out, promote the recruitment of pubococcygeus muscles, maximize gain of muscle strength and decrease the urinary losses. Thus, the study aims to assess the effectiveness of the use of vaginas cones in the

treatment of female urinary incontinence through a literature review.

Material and Methods

This is a review study, exploratory and descriptive. The search was conducted in the period April-June 2016 which to obtain the data descriptors were chosen according to DeCS lists (Cones Dildo, Incontinence and Physiotherapy) and MeSH (Vaginal cones, Urinary Incontinence and Physiotherapy). The bibliographic research was conducted on the portal of Bireme (LILACS and SCIELO), Pubmed/ Medline and portal CAPES. Articles published in Portuguese and English were selected, with restriction on the publication year (1995-2016) and that addressed the use of vaginal cones for the treatment of female urinary incontinence. The literature review of articles available were excluded.

Results

Initially identified 165 articles in Pubmed portal, 21 in Bireme portal and 80 in the journal CAPES. After examining 266 articles and analysis of references of selected articles, 12 studies were included and used for the development of research. The articles dealt with the treatment of women with stress urinary incontinence using only the vaginal cones or comparing its use with muscle pelvic floor training by perineal exercises, electrical stimulation or no treatment.

Vanessa Ponte
vanessamonte@ufpe.br