

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Padronização da co-cultura de *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans* e *Lactobacillus crispatus*: um novo método para caracterização da atividade antimicrobiana**

FERNANDA GOMES CARDOSO

Porto Alegre, 2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Padronização da co-cultura de *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans* e *Lactobacillus crispatus*: um novo método para caracterização da atividade antimicrobiana**

Dissertação apresentada por **Fernanda Gomes Cardoso**  
para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências  
Farmacêuticas

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Tiana Tasca

Porto Alegre, 2024

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Farmácia de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 28 junho de 2024, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Juliana Caierão

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Marilene Henning Vainstein

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Marilise Brittes Rott

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

#### CIP - Catalogação na Publicação

Cardoso, Fernanda Gomes  
Padronização da co-cultura de *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans* e *Lactobacillus crispatus*: um novo método para caracterização da atividade antimicrobiana / Fernanda Gomes Cardoso. -- 2024.  
182 f.  
Orientadora: Tiana Tasca.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Candidíase. 2. Co-cultura. 3. Métodos. 4. Microbiota. 5. Tricomoniase. I. Tasca, Tiana, orient. II. Título.

### **Descrição**

Este trabalho foi desenvolvido nos laboratórios de Pesquisa em Parasitologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e no Laboratório de Biofilmes e Biodiversidade Microbiana do Centro de Biotecnologia da UFRGS. Esse trabalho foi financiado pela FAPERGS (Termo de Outorga: 21/2551–0000128-3) e faz parte do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Impressão 3D e Materiais Avançados Aplicados à Saúde Humana e Veterinária – INCT\_3D-Saúde, financiado pelo CNPq, Brasil (Termo de Outorga: 406436/2022-3). Durante o desenvolvimento desta dissertação, a discente Fernanda Gomes Cardoso recebeu bolsa de estudos da CAPES (Termo de Outorga: 88887.700065/2022-00) e a orientadora Tiana Tasca recebeu bolsa de Produtividade em Pesquisa do CNPq (Termo de Outorga: 309764/2021–1).



## **Agradecimentos**

Ao longo deste trabalho, o incentivo e o apoio de inúmeras pessoas foram de extrema importância para a sua realização. Sem elas, com certeza, eu não teria conseguido. Primeiramente, agradeço aos meus pais, Ana e Fernando, que me apoiam em todas as minhas decisões e por me amarem incondicionalmente. Este título também é de deles. Sem o apoio e confiança depositada em mim, nada seria possível. Amo vocês profundamente.

Ao meu noivo, Gabriel, o meu porto seguro. Obrigada por entender a importância que este título tem para mim. E à sua família - Cristina, César, Annelize, Rodrigo, Alzira e Manuela - que há seis anos são minha família e sempre me trazem amor e carinho.

À minha família, em especial meus tios Louveli, Maira e Milton, que estão presentes em todos os momentos da minha vida. Ao meu tio Sérgio, que não está mais presente fisicamente neste mundo, mas que permanece em meu coração.

À minha orientadora, Tiana Tasca, por ser a professora que me cativou desde nosso primeiro contato, ainda na graduação. Por ser essa orientadora que entende os alunos, mas que sempre nos incentiva a melhorar e seguir em frente. Sou extremamente grata por fazer parte do grupo de pesquisa que ela construiu. Obrigada Tiana, por ser essa orientadora tão inspiradora e por sempre acreditar no meu potencial, até quando eu não acredito. À minha co-orientadora do coração, Graziela, por ser a pessoa que me inspira e acredita no meu potencial. Obrigada por me incluir em sua tese como aluna de iniciação científica, o que me incentivou a seguir na carreira acadêmica e me transformou cientificamente.

Ao meu grupo GPTrico - Ágata, Catarine, Eduarda, Giulia, Luisa, Magno, Saulo e Tiana – por serem minha família e minha segunda casa. Vocês me incentivam e são meu alicerce para o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Aos meus colegas que tornaram meus melhores amigos - Graziela, Giulia e Saulo – que são aquelas pessoas para quem posso correr quando um experimento não dá certo e que sempre têm uma solução. Além disso, são aqueles com quem posso tomar um café e rir da vida. Obrigada por todo o apoio e por serem uma inspiração. Ao Professor Alexandre e seus alunos, que me receberam de braços abertos em seu laboratório. Nossa parceria é de extrema importância para minha jornada acadêmica. Em especial, agradeço ao Rodrigo, à Dayse e à Deisiane por se tornarem meus amigos em quem posso contar para tudo.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, especialmente à Faculdade de Farmácia e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

À CAPES pela bolsa de mestrado que permitiu minha dedicação exclusiva a este trabalho. Aos membros da banca examinadora por terem aceitado o convite.





## RESUMO

Disbiose é o desequilíbrio na microbiota vaginal, normalmente dominada por *Lactobacillus*. As principais causas são vaginose, vaginite e infecções sexualmente transmitidas (ISTs). Embora em baixa quantidade, há uma comunidade fúngica presente na microbiota vaginal das mulheres, sendo *Candida albicans* a levedura mais predominante. No entanto, esta levedura pode causar vaginite infecciosa, conhecida como candidíase vulvovaginal (CVV), que está associada a casos recorrentes. A IST não viral mais comum do mundo é a tricomoníase, causada pelo protozoário flagelado extracelular *Trichomonas vaginalis*. Essa infecção está associada ao aumento da transmissão e aquisição de HIV/AIDS. Ambas, tricomoníase e CVV, apresentam isolados resistentes ao tratamento, destacando a necessidade de novos fármacos. Neste contexto, esta dissertação teve como objetivo padronizar a co-cultura de *T. vaginalis*, *C. albicans* e *L. crispatus* a fim de simular o microambiente vaginal, funcionando como uma ferramenta de testagem de compostos ativos almejando novos fármacos. Neste contexto, esta dissertação teve como objetivo padronizar a co-cultura de *T. vaginalis*, *C. albicans* e *L. crispatus* a fim de simular o microambiente vaginal, funcionando como uma ferramenta de testagem de compostos ativos almejando novos fármacos. O meio de cultura selecionado foi o meio líquido de De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) e a densidade inicial de isolados ATCC ou clínico fresco de *T. vaginalis*, *C. albicans* e *L. crispatus* foi de  $1,00 \times 10^6$  trofozoítos/mL,  $3,33 \times 10^4$  UFC/mL e  $5,53 \times 10^6$  UFC/mL (LC2, co-cultura com o isolado ATCC) ou  $5,53 \times 10^7$  UFC/mL (LC1, co-cultura com o isolado clínico fresco), respectivamente. O meio MRS e densidade inicial escolhidos promoveram, após 24 horas de incubação, um pH próximo a 5,0 e uma média de densidade de  $2,0 \times 10^6$  trofozoítos/mL para os isolados de *T. vaginalis*,  $2,6 \times 10^6$  UFC/mL para *C. albicans* e  $7,9 \times 10^6$  UFC/mL para LC2 e  $8,3 \times 10^6$  UFC/mL para LC1. Com a padronização, observou-se que maiores densidades de *L. crispatus* influenciaram na viabilidade celular de *C. albicans* e do isolado ATCC de *T. vaginalis*. Os valores de MIC para metronidazol de isolados de *T. vaginalis* e MFC para fluconazol de *C. albicans* reduziram (2 vezes para o isolado ATCC e 4 vezes para o isolado clínico) na co-cultura quando comparados com a monocultura. Além disso, a co-cultura aumentou a citotoxicidade do isolado ATCC, inibiu a formação de biofilme e a atividade metabólica do biofilme de *C. albicans* (em até 92% e 90%, respectivamente) e a transição de levedura para hifa de *C. albicans* (em até 70%). Este conjunto de resultados sugere que este sistema *in vitro* é um método eficiente para avaliar a eficácia antimicrobiana de novos compostos contra patógenos da vaginite e para avaliar interações entre microrganismos.

**Palavras-chave:** Atividade antimicrobiana; *Candida albicans*; Co-cultura; Disbiose; Fatores de virulência; *Lactobacillus*; *Trichomonas vaginalis*.



## ABSTRACT

Dysbiosis is an imbalance in the vaginal microbiota, typically dominated by *Lactobacillus*. It is commonly caused by bacterial vaginosis, vaginitis, and sexually transmitted infections (STIs). Although in low quantities, a fungal community, with *Candida albicans* being the most predominant yeast, is found in the vaginal microbiota of women. However, this yeast can cause infectious vaginitis, known as vulvovaginal candidiasis (VVC), which often recurs. The most common non-viral STI globally is trichomoniasis, caused by the extracellular flagellated protozoan *Trichomonas vaginalis*. This infection is associated with an increased risk of HIV/AIDS transmission and acquisition. Both trichomoniasis and VVC exhibit treatment-resistant isolates, emphasizing the need for new therapies. In this context, this dissertation aimed to standardize the co-culture of *T. vaginalis*, *C. albicans*, and *L. crispatus* to mimic the vaginal microenvironment, serving as a system for testing active compounds to develop new drugs. The chosen culture medium was de Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) liquid medium, with an initial density of ATCC or fresh clinical isolates of *T. vaginalis*, *C. albicans*, and *L. crispatus* set at  $1.00 \times 10^6$  trophozoites/mL,  $3.33 \times 10^4$  CFU/mL, and  $5.53 \times 10^6$  CFU/mL (LC2, co-culture with the ATCC isolate) or  $5.53 \times 10^7$  CFU/mL (LC1, co-culture with the fresh clinical isolate), respectively. The selected MRS medium and initial density yielded a pH close 5.0 and an average density of  $2.00 \times 10^6$  trophozoites/mL for *T. vaginalis* isolates,  $2.6 \times 10^6$  CFU/mL for *C. albicans*, and  $7.9 \times 10^6$  CFU/mL for LC2 and  $8.3 \times 10^6$  CFU/mL for LC1 after 24 hours of incubation. Standardization revealed that higher densities of *L. crispatus* influenced the cell viability of *C. albicans* and the ATCC isolate of *T. vaginalis*. MIC values for metronidazole of *T. vaginalis* isolates and MFC values for fluconazole of *C. albicans* decreased (2 times for the ATCC isolate and 4 times for the clinical isolate) in co-culture compared to monoculture. Additionally, co-culture increased the cytotoxicity of the ATCC isolate, inhibited biofilm formation (up to 92%), and reduced its metabolic viability of *C. albicans* (up to 90%), as well as the yeast-to-hyphal transition of *C. albicans* (up to 70%). These results suggest that this *in vitro* system is an effective method for evaluating the antimicrobial efficacy of new compounds against pathogens causing vaginitis and for studying interactions between microorganisms.

**Keywords:** Antimicrobial activity; *Candida albicans*; Co-culture; Dysbiosis; *Lactobacillus*; *Trichomonas vaginalis*; Virulence factors.



## LISTA DE FIGURAS

### Estudo da arte:

<b>Figura 1</b> - Morfologia do trofozoíto de <i>T. vaginalis</i> com suas estruturas e funções principais.....	26
---	----

### Capítulo II

<b>Figure 1</b> - Growth kinetic curves of monocultures and co-cultures of <i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Candida albicans</i> and <i>Lactobacillus crispatus</i> .....	92
--	----

<b>Figure 2</b> - Cytolysis measured by LDH release from human vaginal epithelial cells co-incubated with monocultures or co-cultures of <i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Candida albicans</i> and <i>Lactobacillus crispatus</i> .....	96
--	----

<b>Figure 3</b> - Phase and fluorescence microscopy images.....	98
---	----

<b>Figure 4</b> - Hemolysis of erythrocytes co-incubated with monocultures or co-cultures of <i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Candida albicans</i> and <i>Lactobacillus crispatus</i> .....	99
--	----

<b>Figure 5</b> - Biofilm Formation and Viability of <i>Candida albicans</i> and <i>Lactobacillus crispatus</i> in Monoculture and Co-culture.....	102
--	-----

<b>Figure 6</b> - Yeast-to-hyphal form transition of <i>Candida albicans</i> in monoculture and co-culture .....	103
--	-----

<b>Figure 7</b> - Scanning electron microscopy of ATCC 30236 and TV-LACM6 isolates in monoculture or co-culture with ATCC 24433 <i>C. albicans</i> and CCT 7595 <i>L. crispatus</i> .....	104
---	-----

### Anexo 1

<b>Figure 1</b> - Worldwide distribution of registered patents by country .....	160
---	-----



## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

**Table 1** - Summary co-incubation/co-culture studies on sexually transmitted infections (STIs) microorganisms, vaginal microbiota, vaginal cells, and immune cells..... 49

### Capítulo II

**Table 1** - Initial densities of ATTC 30236 *Trichomonas vaginalis* isolate (TV), *Candida albicans* (CA) and *Lactobacillus crispatus* (LC) for Checkerboard assays. Summary of microorganism combinations (monoculture or co-culture) chosen for subsequent assays with mean trophozoites/mL  $\pm$  SD of TV, mean CFU/mL  $\pm$  SD CA and LC after 24 h ..... 89

**Table 2** - The mean viability of TV-LACM6 *Trichomonas vaginalis* isolate, *Candida albicans*, and *Lactobacillus crispatus* after 24h of co-culture ..... 91

**Table 3** - pH values in monocultures and co-cultures of *Lactobacillus crispatus*, *Candida albicans* and *Trichomonas vaginalis* .....93

**Table 4** - Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) and Minimum Bactericidal or Fungicidal Concentrations (MBC or MFC) of Metronidazole (MTZ), Fluconazole (FLZ), and Streptomycin/Penicillin (S/P) for *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans*, and *Lactobacillus crispatus* in Monocultures and Co-cultures, and Comparative Trophozoites/mL or CFU/mL..... 94

### Anexo 1

**Table 1** - Most common diagnostic methods for the detection of *T. vaginalis* approved by the Food and Drug Administration (FDA/USA) .....154

**Table 2** - Patents found in the databases INPI (Brazil), CIPO (Canada), UPSTO (USA), KIPO (Republic of Korea), ESPACENET (Europe), LATIPAT (Latin America), AUSPAT(Australia), and CPO (China)..... 162





## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>REVISÃO DO TEMA</b> .....	<b>25</b>
<i>Trichomonas vaginalis</i> .....	26
<b>Tricomoníase</b> .....	28
<i>Candida albicans</i> .....	31
<b>Candidíase vulvovaginal</b> .....	34
<b>Eubiose versus Disbiose</b> .....	38
<b>Infecções mistas</b> .....	40
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>41</b>
Objetivo Geral .....	42
Objetivos específicos .....	42
<b>CAPÍTULO I: Cardoso, Fernanda Gomes; Tasca, Tiana. Advancements in Vaginal Microbiota, <i>Trichomonas vaginalis</i>, and Vaginal cell Interactions: Insights from Co-culture Assays. Manuscrito será submetido para <i>Microbes and Infection</i></b> .....	<b>43</b>
<b>CAPÍTULO II: Cardoso, Fernanda Gomes; Santos, Luisa Trindade; Menezes, Saulo Almeida; Rigo, Graziela Vargas; Tasca, Tiana. <i>In vitro</i> Co-culture Model of <i>Trichomonas vaginalis</i>, <i>Candida albicans</i>, and <i>Lactobacillus crispatus</i>: A Tool for Assessing Antimicrobial Activity and Microorganism Interactions in Vaginitis. Manuscrito será submetido para <i>European Journal of Clinical Microbiology &amp; Infectious Diseases</i></b> .....	<b>77</b>
<b>DISCUSSÃO GERAL</b> .....	<b>121</b>
<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>127</b>
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>129</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>131</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>151</b>
.....	182
<b>Anexo 1: Artigo de revisão publicado: Cardoso, Fernanda Gomes; Freitas, Mariana Dicki; Tasca, Tiana; Rigo, Graziela Vargas. From Wet Mount to Nucleic Acid Amplification Techniques: Current Diagnostic Methods and Future Perspectives Based on Patenting of New Assays, Stains, and Diagnostic Images for <i>Trichomonas vaginalis</i> Detection. <i>Venereology</i> 2024, 3, 35-50</b> .....	<b>153</b>
<b>Anexo 2: Lista de artigos publicados na vigência do mestrado</b> .....	<b>169</b>
<b>Anexo 3: Parecer Consubstanciado do CEP</b> .....	<b>171</b>



## **INTRODUÇÃO**

A eubiose vaginal é caracterizada pela predominância de bactérias do gênero *Lactobacillus*, representando quatro dos sete tipos de comunidades estabelecidas na microbiota vaginal (RAVEL *et al.*, 2011; FRANCE *et al.*, 2020). O domínio liderado principalmente por *L. crispatus* confere maior proteção contra infecções causadas por diferentes microrganismos, uma vez que essas bactérias produzem substâncias antimicrobianas, como ácido láctico, bacteriocinas e peróxido de hidrogênio (KALIA *et al.*, 2020). Apesar de em menor quantidade, outros microrganismos podem estar presentes na microbiota, como *Gardnerella* spp., *Prevotella* spp., *Streptococcus* spp., *Ureaplasma* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Clostridium* spp., *Mycoplasma* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia coli*, *Bifidobacterium*, *Veillonella* spp. e *Candida* spp (LARSEN e MONIF, 2001; VALENTI *et al.*, 2018).

A perturbação da homeostase na microbiota vaginal aumenta o risco de infecções oportunistas e facilita o estabelecimento de infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) (BROTMAN *et al.*, 2012). Além disso, a presença de leveduras do gênero *Candida* spp. na mucosa como um microrganismo comensal pode representar um fator de risco para o desenvolvimento de vaginite infecciosa (WILLEMS *et al.*, 2020). Fatores do hospedeiro predisponentes, como diabetes, uso de antibióticos, microbiota vaginal e fatores hormonais, estão relacionados com a candidíase vulvovaginal (CVV), a segunda causa mais comum de vaginite (ANDERSON *et al.*, 2004; FARR *et al.*, 2021). Aproximadamente 138 milhões de mulheres são afetadas por CVV recorrente, caracterizada por quatro ou mais episódios da infecção por ano (DENNING *et al.*, 2018). É estimado que 75 % das mulheres terão um episódio pelo menos de CVV, sendo que 40-45% terão mais de um episódio (WORKOWSKI *et al.*, 2021). Das cinco espécies de *Candida* mais comumente associadas à CVV, *C. albicans* é a responsável pela maioria dos casos (FAAR *et al.*, 2021). Juntamente com a elevada incidência de casos recorrentes de CVV, o surgimento de isolados resistentes ao tratamento oral mais utilizado, o fluconazol, está relacionado com o uso prolongado do medicamento (BAUTERS *et al.*, 2002; SOBEL *et al.*, 2018; FAAR *et al.*, 2021).

A IST de origem não viral mais comum no mundo é a tricomoníase, causada pelo protozoário flagelado extracelular *Trichomonas vaginalis*, com 156 milhões novos casos em todo mundo estimados em 2016 (ROWLEY *et al.*, 2019). A infecção está intimamente relacionada a um microambiente disbiótico dominado por bactérias causadoras de vaginose bacteriana (VB) estão em predominância (BROTMAN *et al.*, 2012). Aproximadamente 80%

dos casos – incluindo mulheres e homens - são assintomáticos, dificultando o diagnóstico e tratamento, o que pode levar infecções crônicas e complicações. (POOLE e MCCLELLAND, 2013; WORKOWSKI *et al.*, 2021). *T. vaginalis* aumenta a transmissão e a aquisição de HIV/AIDS, contribuindo para a epidemia de HIV em regiões endêmicas para tricomoníase (KISSINGER *et al.*, 2013). Portanto, é crucial o desenvolvimento de novos fármacos eficazes para controlar a infecção e, assim, reduzir o risco de transmissão de HIV. O tratamento aprovado pelo ‘*Food and Drug Administration*’ (FDA) inclui os fármacos pertencentes à classe dos 5-nitroimidazóis: metronidazol, tinidazol e secnidazol, apresentando um mecanismo de ação idêntico e estão associados a efeitos adversos que podem comprometer a adesão ao tratamento (MILLER e NYIRJESY, 2011; WORKOSKI *et al.*, 2021; MUZNY e VAN GERWEN, 2022). Além disso, a sensibilidade desses fármacos tem sido significativamente reduzida devido a mecanismos de resistência. A taxa de reinfecção da tricomoníase varia de 5% a 31%, podendo atingir até 53% em mulheres infectadas por HIV (MAGNUS *et al.* 2003; KISSINGER *et al.* 2008; MUZNY *et al.*, 2008).

Nosso grupo de pesquisa tem conduzido estudos *in vitro* sobre novas moléculas por mais de uma década, contribuindo significativamente na busca por novos compostos tricomonocidas, tanto a partir de produtos naturais e quanto de derivados sintéticos (BRUM VIEIRA *et al.*, 2015). Neste contexto, destacamos o composto 1,10-fenantrolina-5,6-diona (fendiona), derivado do fenantreno, que pode estar associado a complexos metálicos, como cobre e prata, os quais demonstram propriedades antimicrobianas (McCANN *et al.*, 2004). Em nossos estudos, observamos uma atividade tricomonocida altamente significativa tanto para fendiona isolada quanto para os complexos de cobre-fendiona e prata-fendiona. Entre eles, o complexo cobre-fendiona apresentou a menor MIC (em inglês, *minimum inhibitory concentration*) para os diferentes isolados de *T. vaginalis* testados (RIGO *et al.*, 2019). Considerando o microambiente vaginal disbiótico associado à tricomoníase, a avaliação da atividade do cobre-fendiona contra bactérias e fungos comensais é de extrema importância. Destaca-se que o cobre-fendiona demonstrou atividade antifúngica e antibiofilme contra diferentes espécies de *Candida* (RIGO *et al.*, 2023).

A interação entre os microrganismos vaginais é complexa e está intrinsecamente ligada à imunidade e à saúde sexual e reprodutiva. A presença simultânea de patógenos responsáveis pela vaginose bacteriana, candidíase vulvovaginal e tricomoníase está intimamente relacionada às condições favoráveis do ambiente vaginal para o desenvolvimento desses microrganismos, resultando em casos de infecções mistas que são relativamente comuns (KALIA *et al.*, 2020).

A coinfeção por *T. vaginalis* e *C. albicans* é frequente e está correlacionada com desconforto local e maior morbidade, demonstrando uma taxa de ocorrência de 15% em um estudo conduzido em uma localidade do México (LÓPEZ-MONTEON *et al.*, 2013). No entanto, há uma lacuna significativa na literatura científica em relação à investigação da interação entre esses microrganismos.

Sistemas *in vitro* buscam replicar condições que ocorreriam em sistemas *in vivo*, porém são incapazes de reproduzir com grande precisão (LORIAN *et al.*, 1989). No entanto, estratégias destinadas a construir um ambiente *in vitro* mais realista podem ser benéficas. A co-cultura emerge como uma estratégia com esse propósito, sendo definida como a combinação de dois ou mais tipos distintos de células em contato, crescendo de forma concomitante. Além disso, a co-cultura é empregada para avaliar a interação entre diferentes tipos de organismos que estão em contato (TEMKIN *et al.*, 2019). Ela também pode ser utilizada para induzir a produção de substâncias de interesse biotecnológico. Em condições de laboratório, microrganismos geralmente não produzem certas substâncias antimicrobianas, mas, quando cultivados em co-cultura, podem ser estimulados a produzi-las. Por exemplo, as bactérias produtoras de ácido láctico podem ser induzidas pela co-cultura com outros microrganismos a produzirem bacteriocinas (CHANOS *et al.*, 2016).

Estudos que avaliam a co-cultura e as interações entre os microrganismos *T. vaginalis* ou *Candida* spp. com a microbiota, sendo representada por espécies de *Lactobacillus* spp., e células vaginais serão abordados no capítulo I desta dissertação. Sobre a relação do protozoário com a microbiota, ressaltamos que *T. vaginalis* é capaz de diminuir a adesão de *Lactobacillus* spp. às células epiteliais vaginais, mas esse efeito não ocorre com bactérias associadas à vaginose bacteriana (FICHOROVA *et al.*, 2013). Em relação à interação entre *Lactobacillus* spp. e *Candida* spp., foi demonstrado que *L. fermentum* possui a capacidade de inibir o crescimento e a aderência em células HeLa e mucina de diferentes isolados de *Candida* (CARMO *et al.* 2016). Outro estudo revelou que os biosurfactantes produzidos por *L. crispatus* são capazes de modificar a adesão tanto *in vitro* quanto *in vivo* de *Candida* spp. (GREGORIO *et al.* 2020).

Para o desenvolvimento de novas moléculas destinadas ao tratamento da tricomoníase e candidíase, são necessárias diversas etapas de pesquisa, que incluem estudos pré-clínicos nos quais são realizados testes *in vitro* e *in vivo*, além de estudos clínicos. Até o momento, não existe uma padronização de um modelo *in vivo* para a infecção por *T. vaginalis*, o que representa um obstáculo significativo para o avanço de novos fármacos. Portanto, a padronização de

metodologias *in vitro* que possam simular as condições *in vivo* pode ser uma abordagem promissora. Este trabalho visa padronizar a co-cultura de *T. vaginalis*, *C. albicans*, *L. crispatus* com o objetivo de reproduzir o microambiente vaginal. Podendo permitir a realização de um único teste para avaliar a atividade antimicrobiana contra *T. vaginalis* e *C. albicans*, além de verificar se a molécula inibe o crescimento do microrganismo que representa a microbiota saudável de uma mulher, *L. crispatus*. Adicionalmente, também é possível investigar as interações entre esses microrganismos e como a co-cultura pode influenciar a produção de fatores de virulência.

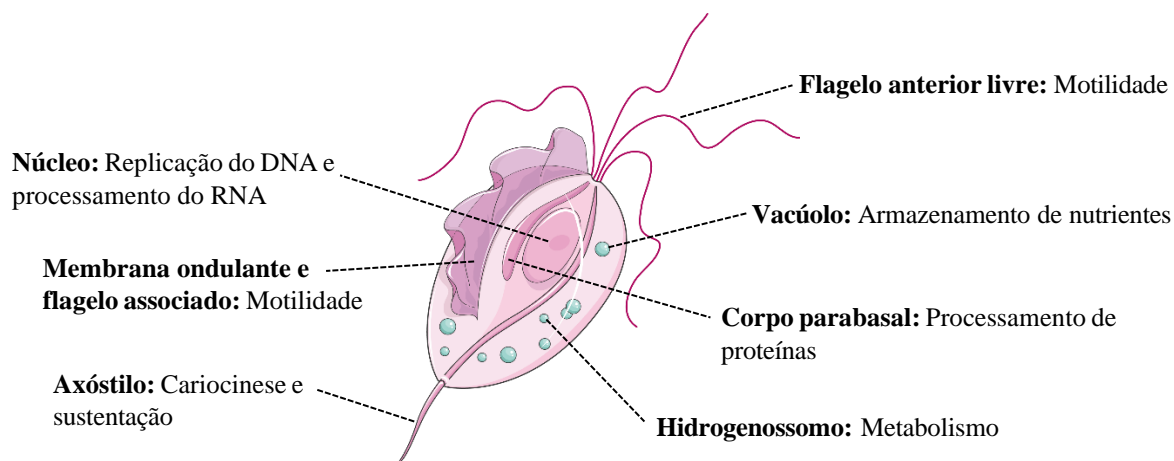




**REVISÃO DO TEMA**

## 1. *Trichomonas vaginalis*

*T. vaginalis* é um protozoário extracelular identificado por Alfred Donné em 1836, que descreveu como um microrganismo móvel encontrado na secreção vaginal purulenta e espumosa de mulheres que apresentavam corrimento e irritação no local (HARP *et al.*, 2011). O parasito pertence ao filo Zoomastigina devido à presença de flagelos, à classe Parabasalia pela existência do corpo parabasal (figura 1). É amitocôndriado, mas apresenta hidrogenossomos, organelas produtoras de energia do parasito e semelhantes às mitocôndrias presentes em seres humanos (figura 1). *T. vaginalis* pertence à ordem Trichomonadida e à família Trichomonadidae (SCHWEBKE e BURGESS 2004).



**Figura 1:** Morfologia do trofozoíto de *T. vaginalis* com suas estruturas e funções principais. (BENCHIMOL, 2004). Adaptado: [https://smart.servier.com/smart\\_image/trichomonas/](https://smart.servier.com/smart_image/trichomonas/) (imagem);

O ciclo de vida de *T. vaginalis* é simples, habita o trato genital inferior das mulheres e a uretra e a próstata dos homens, sua multiplicação se dá por divisão binária longitudinal. O parasito apresenta apenas a forma de trofozoíto, não sendo capaz de sobreviver fora do seu hospedeiro, os seres humanos. A forma de transmissão de *T. vaginalis* ocorre principalmente por relações sexuais, pois o protozoário permanece na vagina e no orifício da uretra (CDC, 2017).

O trofozoíto pode ser cultivado em laboratório, assumindo principalmente a forma piriforme em meio de cultura, mas *in vivo* se adere às células vaginais, prostáticas e uretrais, adquirindo um formato ameboide (NIELSEN M. e NIELSEN R., 1975). O seu tamanho varia em torno de 10  $\mu\text{m}$  de comprimento e 7  $\mu\text{m}$  de largura (HONIGBERG e KING, 1964). O

trofozoíto pode modificar sua conformação, tornando-se um pseudocisto ou forma endoflagelar em resposta a condições desfavoráveis, como restrição de nutrientes e baixo pH. O pseudocisto é arredondado e imóvel, pois tem os flagelos internalizados (BERI *et al.*, 2020). A forma ameboide, além de promover a adesão às células através dos pseudópodes, é importante para a aquisição de nutrientes, pois externaliza essas estruturas e fagocita bactérias, fragmentos necróticos das células epiteliais, espermatozoides e hemácias (HONIGBERG e BRUGEROLLE, 1990). A adesão às células do hospedeiro é promovida por meio de adesinas, fibronectina, laminina e glicolipídios (HARP *et al.*, 2011).

*T. vaginalis* necessita de nutrientes essenciais para o seu desenvolvimento e sobrevivência, sendo eles carboidratos, aminoácidos, lipídeos, nucleotídeos púricos e pirimidínicos, ferro, vitaminas e sais inorgânicos. Carboidratos são a principal fonte de energia provindo do metabolismo fermentativo tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias. Macromoléculas como purinas, pirimidinas e alguns lipídios não são sintetizados *de novo* pelo parasito, sendo necessária a aquisição através do hospedeiro pela fagocitose de células epiteliais e de microrganismos (MACK e MÜLLER, 1980; MÜLLER, 1988). O ferro desempenha um papel importante em enzimas hidrogenossomais como a ferredoxina e a piruvato-ferredoxina óxido redutase (PFOR), que são responsáveis pelo metabolismo fermentativo e produção de energia. No hospedeiro, o parasito obtém o ferro através da lactoferrina presente em células epiteliais e eritrócitos (MORENO-BRITO *et al.*, 2005; TORRES-ROMERO e ARROYO, 2009).

Sistemas redox e antioxidantes são essenciais para a sobrevivência do parasito anaeróbio. Considerando um ambiente microaerófilo, onde há a presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) que têm efeitos prejudiciais ao parasito, ele é capaz de expressar genes que regulam moléculas de defesa, como superóxido dismutases, tiorredoxina redutases, peroxirredoxinas e rubrerritinas (HARP *et al.*, 2011). O ambiente vaginal está sujeito a mudanças constantes, incluindo variações hormonais relacionadas ao ciclo menstrual, a composição da microbiota no momento da infecção, infecções por outros microrganismos já presentes na região e disponibilidade de nutrientes. Portanto, *T. vaginalis* precisa ser capaz de se adaptar a esse ambiente hostil para garantir sua sobrevivência e crescimento dentro do hospedeiro (PETRIN, 1998; PEREIRA-NEVES e BENCHIMOL, 2007; LEITSCH *et al.*, 2018).

## 1.1 Tricomoníase

A tricomoníase é a infecção sexualmente transmissível não viral mais comum no mundo, cujo agente etiológico é o *T. vaginalis*. Em 2016, estimou-se a prevalência em mulheres e homens entre 15 e 49 anos em 5,3% e 0,6%, respectivamente. Houve um total de 156 milhões de novos casos, indicando uma incidência maior do que sífilis, clamídia e gonorreia (ROWLEY *et al.* 2019). Nos Estados Unidos, em 2018, estimou-se uma incidência de 6,9 milhões de novos casos (LEWIS *et al.*, 2021). No entanto, esses dados são subestimados devido a diversos fatores: aproximadamente 80% dos casos são assintomáticos (WORKOWSI *et al.*, 2021); há escassez de estudos de prevalência de qualidade publicados na literatura; a técnica principal de diagnóstico, exame direto a fresco, possui baixa sensibilidade; além disso, a tricomoníase não é uma doença de notificação obrigatória e não existe sistema de vigilância para detectar isolados resistentes ao tratamento, resultando na falta de ênfase dos programas de saúde pública de controle de ISTs (MCCLELLAND, 2008; VAN GERWEN *et al.*, 2021).

As manifestações clínicas da tricomoníase podem variar significativamente, apresentando-se de forma aguda ou crônica (LEHKER e ALDERETE, 2000). Nas mulheres sintomáticas, uma infecção aguda é caracterizada por corrimento purulento e malcheiroso, irritação e prurido vulvar, dor abdominal e disúria. O sinal clínico específico da tricomoníase e a presença de pontos hemorrágicos na mucosa vaginal ou cervical, com edema e eritema. Esse é um achado bastante característico da tricomoníase, conhecido como *colpitis macularis* ou cérvix com aspecto de morango (MENEZES *et al.*, 2016a). Por outro lado, nos homens, a infecção geralmente é autolimitada e transitória, entretanto quando há sintomas estão relacionados com uretrite purulenta, epididimite e prostatite (HIRT *et al.*, 2015). Os casos assintomáticos - estimados em 80% - estão associados ao curso crônico da infecção, o que pode levar à disseminação do parasito e complicações tanto em homens quanto em mulheres (POOLE e MCCLELLAND, 2013; WORKOWSKI *et al.*, 2021). Entre as mulheres, as complicações incluem infertilidade, associação da infecção com câncer cervical, doença inflamatória pélvica e problemas durante a gestação, como parto prematuro (VAN GERWEN *et al.*, 2021; EDWARDS *et al.*, 2016). Em homens, infertilidade e uma possível associação entre a inflamação causada pelo *T. vaginalis* com o câncer de próstata são complicações da tricomoníase (SUTCLIFFE, 2010).

A infecção por *T. vaginalis* está associada ao aumento da suscetibilidade à aquisição e transmissão do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (SORVILLO *et al.*, 2001; MASHA *et*

al., 2019). Isso pode ser explicado por quatro mecanismos distintos: a indução de uma resposta pró-inflamatória na mucosa cérvico-vaginal, a supressão da imunidade inata da mucosa durante a infecção, o enfraquecimento ou ruptura da integridade da mucosa cérvico-vaginal e a alteração da microbiota vaginal normal e do pH (MAKAROVA *et al.*, 2017). Além disso, *T. vaginalis* apresenta mecanismos específicos que potencializam o risco de aquisição do HIV: danos na monocamada do epitélio hospedeiro; recrutamento de linfócitos CD4+ e macrófagos à mucosa vaginal e cervical; secreção de cisteína peptidases que degradam o inibidor de protease leucocitária secretória (SLPI), uma molécula responsável por proteger as mucosas contra patógenos e na prevenção da transmissão do HIV (GILBERT *et al.*, 2000; ALVAREZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2007).

No anexo I desta dissertação é apresentado o artigo de revisão publicado no início de 2024, sobre as técnicas de diagnóstico da tricomoníase utilizadas atualmente, intitulado “*From Wet Mount to Nucleic Acid Amplification Techniques: Current Diagnostic Methods and Future Perspectives Based on Patenting of New Assays, Stains, and Diagnostic Images for Trichomonas vaginalis Detection*”. Como os sintomas são de amplo espectro, o diagnóstico clínico da tricomoníase muitas vezes não é eficaz, tornando essencial recorrer ao diagnóstico laboratorial para conter a propagação da infecção. O método mais comumente utilizado é o exame direto a fresco, porém este apresenta limitada sensibilidade. Outras abordagens incluem coloração, cultura, sorologia e técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (TAAN). Estes métodos estão listados em ordem crescente de sensibilidade e custo, sendo que as TAAN representam o padrão ouro para o diagnóstico da tricomoníase, devido à sua maior sensibilidade (CARDOSO *et al.*, 2024).

O tratamento da tricomoníase aprovado pelo FDA envolve o uso de fármacos pertencentes à classe dos 5-nitroimidazóis, metronidazol, tinidazol e secnidazol (WENDEL e WORKOWSKI, 2007; MUZNY e VAN GERWEN, 2022). O mecanismo de ação desses fármacos consiste na redução do grupamento nitro pelas enzimas piruvato ferredoxina oxidoreductase (PFOR) e hidrogenase presentes nos hidrogenossomos do parasito, após a penetração do pró-fármaco por difusão. Esse processo interrompe a produção de hidrogênio e libera radicais nitro citotóxicos, os quais causam danos no DNA, resultando na morte dos parasitos (KULDA, 1999). As reações adversas associadas ao tratamento incluem náuseas, cefaleia, insônia, vertigem e sonolência (MILLER e NYIRJESY, 2011).

Em 1959, o metronidazol foi aprovado para o uso para o tratamento da tricomoníase, mas apenas três anos depois, foram observados relatos de falha terapêutica. Apesar de ser uma IST

curável, a tricomoníase está frequentemente associada a falhas terapêuticas devido à resistência de isolados de *T. vaginalis* aos fármacos da classe 5-nitroimidazóis (DUNNE *et al.*, 2003). Aproximadamente 9,6% dos isolados são resistentes ao metronidazol e tinidazol *in vitro* (SCHWEBKE e BARRIENTES, 2006). Um estudo recente em KwaZulu-Natal, África do sul, demonstrou que os isolados de *T. vaginalis* apresentaram níveis de resistência de 11% ao metronidazol, 2% para tinidazol e 1% para secnidazol. Além disso, isolados de *T. vaginalis* provenientes de mulheres com vaginose bacteriana apresentaram altas concentrações inibitórias mínimas (MICs) para os três fármacos (MTSHALI *et al.*, 2022). Levando em conta dados de prevalência e incidência, estima-se que cerca de 10 milhões de pessoas infectadas por *T. vaginalis* no mundo não tenham sua infecção tratada efetivamente devido à ineficácia do tratamento (SECOR *et al.*, 2014). A resistência do parasito pode ser aeróbia, associada à presença de oxigênio, no qual ocorre a oxidação de grupos ativos; ou anaeróbia, induzida em laboratório, que está ligada à redução das enzimas hidrogenossomais ativas responsáveis pela ativação do fármaco (KULDA, 1999; RIGO e TASCA, 2020).

A interação parasito-hospedeiro é um processo complexo que abrange a patogenicidade da tricomoníase. Os mecanismos de virulência do parasito que serão descritos nesta dissertação são a citoaderência, a citotoxicidade e a hemólise. Para que *T. vaginalis* consiga aderir às células epiteliais vaginais e, conseqüentemente, colonizar o trato urogenital humano, é necessário degradar o muco que protege essas células. O muco é composto principalmente por mucina, uma glicoproteína com aspecto de gel, que funciona como uma barreira física a microrganismos (GERKEN, 1993). Para romper essa barreira, o trofozoíto se liga ao muco e libera enzimas capazes de degradar a mucina, as mucinases (LEHKER e SWEENEY, 1999).

Diversos fatores regulam a citoaderência do trofozoíto, um processo crucial para a promoção da infecção crônica. Estes fatores incluem adesinas (AP120, AP65, AP51, AP33 e AP23) (ARROYO *et al.*, 1992), glicoconjugados do citoesqueleto (laminina, fibronectina e colágeno), transdução de sinal, autofagia, ferro, cisteína peptidases, lipoglicanos, entre outros (FIGUEROA-ANGULO *et al.*, 2012). Após a citoaderência, o processo de citotoxicidade é iniciado para promover a aquisição de nutrientes e a evasão do sistema imune do hospedeiro. Destaca-se uma cascata de eventos, como citólise, fagocitose e desintegração da monocamada celular, que são dependentes do contato com a célula (ALDERETE and PEARMAN, 1984). Entretanto, a citotoxicidade pode ser independente de contato célula-parasito, podendo ser atribuída a moléculas produzidas por *T. vaginalis*. Essas moléculas são TvF (*cell-free T.*

*vaginalis culture factor*), CDF (*cell-detaching factor*), fosfolipase A2 e cisteína peptidases (FIGUEROA-ANGULO *et al.*, 2012).

A hemólise é outro fator de virulência do parasito, o ambiente vaginal é pobre em nutrientes, portanto hemácias são consumidas por *T. vaginalis* para a obtenção de ferro e lipídeos (LEHKER e ALDERETE, 2000). Esse processo tem três fases, o contato dos trofozoítos com os eritrócitos, a liberação de cisteína peptidases, como a TvCP30, responsáveis pela formação de poros na membrana e degradação da hemoglobina. Além disso, há a ruptura e a fagocitose do eritrócito, que ocorre através de pseudópodes ou pela extensão da membrana do parasito (ARROYO e ALDERETE, 1989; FIORI *et al.*, 1993).

A colonização de *T. vaginalis* no ambiente vaginal está associada à diminuição da predominância de *Lactobacillus* spp. e ao aumento do pH, para valores acima de 4,5. Um mecanismo que pode explicar esse fenômeno é a capacidade do protozoário de fagocitar células e microrganismos (RENDON-MALDONADO *et al.*, 1998). O protozoário *T. vaginalis* está relacionado a uma microbiota vaginal em que predominam *Mycoplasma* e bactérias anaeróbias, as quais estão associadas a vaginose bacteriana (VB) (MARTIN *et al.*, 2013; BROTMAN *et al.*, 2012). A baixa densidade de *Lactobacillus* está ligada ao aumento da susceptibilidade à candidíase vulvovaginal, VB e aquisição de HIV [DONDEERS *et al.*, 2000; LAI *et al.*, 2009].

## **2. *Candida albicans***

Em 1840, Berg, Gruby e Bennett deram início à busca pelo agente etiológico de uma doença que afetava crianças naquela época, descrevendo esporos vegetais parasitas de animais e seres humanos. No entanto, somente em 1923 que o gênero *Candida* foi oficialmente descrito por Christine Marie Berkhout (LEDERMANN *et al.*, 2017).

*Candida* pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Saccharomycetes, ordem Sacchamycetales e família Saccharomycetaceaea. O gênero *Candida*, a partir dos anos 1970, começou a ser associado a uma elevada incidência de infecções, devido ao aumento no número de pacientes imunocomprometidos. Além disso, a partir da década de 70, as técnicas de detecção de fungos melhoraram, tornando possível a identificação do agente causador de infecções (CHIN *et al.*, 2016). *Candida* tem origem taxonômica nos ascomicetos, sendo uma levedura capaz de causar infecções em seres humanos. *C. albicans* é a espécie mais relevante clinicamente, sendo um fungo oportunista que pode causar infecções superficiais em mucosas ou infecções sistêmicas, principalmente em pacientes imunocomprometidos (ARENDRUP *et*

*al.*, 2002; WANG *et al.*, 2015). Por outro lado, *C. albicans* é um residente comensal de cavidades do corpo humano, incluindo a oral, dermal, gastrointestinal e genital (CALDERONE *et al.*, 2012). Ou seja, podem estar presentes na microbiota de muitas pessoas e não causarem nenhum dano.

As células epiteliais vaginais apresentam receptores específicos de reconhecimento de padrões (PRRs), os quais reconhecem *C. albicans* (PETERS *et al.*, 2014). Além disso, essas células distinguem os fungos presentes no microambiente como comensais ou patogênicos, embora o mecanismo exato ainda seja obscuro. No entanto, sabe-se que as células apresentam uma ação fungistática que confere um estado de comensalismo (ROSELLETTI *et al.*, 2018; RICHARSON *et al.*, 2018). O fato de *C. albicans* permanecer como comensal na mucosa vaginal também se deve à sua capacidade de tolerar uma ampla faixa de pH, além da influência do estrogênio, hormônio feminino presente na região, que atua na aderência da levedura às células (BRADFORD *et al.*, 2017)

O gênero *Candida* é caracterizado por seu crescimento em células leveduriformes individuais, frequentemente apresentando pseudohifas e/ou verdadeiras hifas. Além disso, suas paredes celulares são compostas por  $\beta$ -glucana, e sua reprodução é assexuada por brotamento (HIBBETT *et al.*, 2007). Este fungo dimórfico é comumente encontrado na forma de levedura, embora sua forma micelial pode ser formada sob certas condições específicas (RIGGSBY *et al.*, 1982). As formas celulares variam entre blastoconídeos, que caracterizam o crescimento de uma levedura unicelular em brotamento, e hifas e pseudohifas, que se referem a um crescimento de fungo filamentosos (ODDS *et al.*, 1988).

Essas diferentes morfologias se desenvolvem em resposta a condições ambientais específicas. Em laboratório, por exemplo, células leveduriformes elipsoides predominam em temperaturas mais baixas e pH ácido. No entanto, em condições de 37°C, pH neutro e na presença de soro humano ou bovino, as leveduras tendem a formar hifas longas e estreitas. As pseudohifas se desenvolvem em temperaturas e pH intermediários (WIGHTMAN *et al.*, 2004). As células leveduriformes se multiplicam por brotamento assimétrico e, em meio de cultura sólido, formam colônias lisas e redondas. Em contrapartida, as pseudohifas são formadas através do brotamento unipolar, resultando em cadeias ramificadas de brotos que dão origem a colônias fibrosas e ásperas (BERMAN *et al.*, 2006).

Além da temperatura ou pH, outros sinais ambientais podem modular fatores de transcrição regulatórios que controlam a morfogênese de *C. albicans*, como a disponibilidade



de oxigênio, que pode afetar a formação de hifas e, conseqüentemente, a patogenicidade (LU *et al.*, 2013; VILLA *et al.*, 2020). Restrições de nitrogênio e de aminoácidos também podem induzir a transição de levedura para hifa (FLANAGAN *et al.*, 2017).

O fungo *C. albicans* pode aderir às células epiteliais, sendo essa adesão o passo inicial da infecção, mediada por proteínas chamadas adesinas, como o grupo de proteínas ALS (*agglutinin-like sequence*). Além disso, essas adesinas conferem a capacidade de *C. albicans* de se aderir a outros microrganismos e a ambientes abióticos (GARCIA *et al.*, 2011; VERSTREPEN *et al.*, 2006; DAVID *et al.*, 2023). Após a adesão às células epiteliais, a invasão celular é promovida pelas hifas do fungo dimórfico, causando danos celulares, penetração e inativação do sistema imune. A invasão pode ocorrer por endocitose induzida ou penetração ativa, sendo induzida pela secreção de invasinas, especialmente as enzimas hidrolíticas, incluindo hemolisinas, proteases, lipases e fosfolipases (ZHU *et al.*, 2010; MAYER *et al.*, 2013).

*C. albicans* é capaz de formar biofilme, uma estrutura composta por células de microrganismos aderentes incorporadas em uma matriz extracelular autoproduzida (BLANKENSHIP *et al.*, 2006). Esse biofilme tem um processo de formação complexo, sendo inicialmente necessário a adesão de células fúngicas em uma superfície colonizada, podendo ser abiótica ou biótica. Posteriormente, ocorre o desenvolvimento de hifas e a formação de uma matriz que contém polissacarídeos da parede celular fúngica, como  $\beta$ -glucana, além de proteínas, ácido urônico, entre outros componentes. A última fase da formação do biofilme envolve o crescimento, amadurecimento e dispersão, resultando em uma aparência de uma rede de blastoconídeos, hifas e pseudohifas suspensas na matriz celular (NETT e ANDES, 2006; CHANDRA *et al.* 2001).

Além dos fatores de virulência descritos acima, a capacidade de infectar o hospedeiro também está relacionada às suas características de adaptabilidade (*fitness*). *C. albicans* consegue se adaptar às flutuações do pH do ambiente, apresenta flexibilidade metabólica, possui sistemas eficazes de aquisição de nutrientes e mecanismos robustos contra o estresse (MAYER *et al.*, 2013).

Para se adaptar ao pH do ambiente vaginal, que é próximo a 4, *C. albicans* expressa enzimas da parede celular, como as  $\beta$ -glicosidases do tipo Phr2 (BERNARDIS *et al.*, 1998). Outro mecanismo que contribui para o sucesso da espécie, tanto como comensal quanto como patógeno em humanos, é a sua capacidade de alcalinizar o ambiente através da formação de

hifas quando está em privação de nutrientes. Esse fenômeno ocorre pela clivagem de aminoácidos e aminas, com a exportação de amônia para o meio extracelular, promovendo a elevação do pH (VYLKOVA *et al.*, 2011; MAYER *et al.*, 2013).

As principais fontes de nutrientes provenientes do hospedeiro para *C. albicans* são glicose, lipídeos, proteínas e aminoácidos. A disponibilidade desses nutrientes no ambiente vaginal pode variar, mas *C. albicans* tem mecanismos que respondem rápida e dinamicamente a mudanças no microambiente (MAYER *et al.*, 2013). *C. albicans* expressa proteases e transportadores utilizados na obtenção de proteínas do hospedeiro. Além disso, secreta enzimas associadas a espécies virulentas, como lipases e fosfolipases, que auxiliam na aquisição de nutrientes e na indução de dano celular. Ademais, o catabolismo via  $\beta$ -oxidação é necessário para potencializar a virulência dessa espécie (MIRAMÓN *et al.*, 2017).

*C. albicans* tem mecanismos que permitem a adaptação às condições estressantes do ambiente vaginal, como estresse oxidativo, nitrosativo e pH, os quais são cruciais para sua sobrevivência e virulência (BROWN *et al.*, 2011). O mecanismo para a detoxificação de espécies reativas de oxigênio envolve a ação de enzimas como catalase e superóxido dismutases (WYSONG *et al.*, 1998; HWANG *et al.*, 2002; MARTCHENKO *et al.*, 2004). Para a detoxificação de espécies reativas de nitrogênio, produzidas pelos neutrófilos, é necessária a ação da proteína flavohemoglobina (HROMATKA *et al.*, 2005).

## **2.1. Candidíase vulvovaginal**

Apesar de ser comensal, *Candida* spp. pode proliferar na mucosa vaginal quando há fatores predisponentes, causando inflamação local e levando a sintomas relacionados à candidíase vulvovaginal (CVV) (SOBEL *et al.*, 1996). A CVV é comumente causada por *C. albicans*, mas outras espécies de *Candida* também podem ser responsáveis pela infecção, como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* (FARR *et al.*, 2021). Essas espécies são patógenos oportunistas associados à disbiose, sendo a segunda causa mais comum de infecções vaginais, com a primeira causa sendo a vaginose bacteriana (POWELL *et al.*, 2014).

Os dados epidemiológicos sobre a CVV são subestimados, principalmente devido à falta de notificação dessa infecção às autoridades de saúde pública (SOBEL, 1989a). Além disso, mulheres saudáveis podem carrear *C. albicans* de forma assintomática. Um estudo realizado em Portugal mostrou que a colonização vaginal por *Candida* spp. em mulheres assintomáticas é de 64% (FERNANDES *et al.*, 2022). Estima-se que 75% das mulheres terão pelo menos um

episódio de VVC, e aproximadamente 40-45% apresentarão dois ou mais episódios (WORKOWSI *et al.*, 2021). A CVV recorrente (CVVR) é definida como quatro ou mais episódios da infecção por ano, sendo uma condição bastante debilitante ao longo do tempo, interferindo na qualidade de vida de muitas mulheres e associada a elevados custos econômicos. Aproximadamente 138 milhões de mulheres são afetadas pela CVVR a cada ano em todo mundo, com uma prevalência de 3871 em 100.000 mulheres. Mulheres na faixa etária de 25 a 34 anos são as mais afetadas (DENNING *et al.*, 2018). Em estudo recente conduzido em Gana, CVVR é prevalente em mulheres, sendo estimada uma prevalência de aproximadamente 48% (OTOO-ANNAN *et al.* 2024).

Fatores intrínsecos estão relacionados ao desequilíbrio na interação entre o hospedeiro e o fungo, predispondo as mulheres ao desenvolvimento de CVV ou CVVR. Esses fatores incluem diabetes, estresse crônico, capacidade antioxidante diminuída, uso de antibiótico, inflamação vaginal prévia, contato genital-oral e uso de contraceptivos (LEON *et al.*, 2002; AKIMOTO-GUNTHER *et al.*, 2016). Um estudo demonstrou que uma população na faixa etária de 26 a 40 anos apresenta uma taxa de 44% de uma frequência anual de CVV, com a infecção relacionada a fatores hormonais e comportamentais. Em mulheres com idades entre 41 e 55 anos e 56 anos ou mais, a idade perimenopausal e a pós menopausa, têm taxas de 24,3% e 12,9%, respectivamente, ligadas ao aumento do uso do estrogênio exógeno e às condições de saúde prévias (YANO *et al.*, 2019).

Os sintomas relacionados com a infecção são prurido vaginal, dor durante o ato sexual, desconforto ao urinar e corrimento vaginal anormal (GONÇALVES *et al.*, 2016). A CVV pode ser classificada como não complicada ou complicada, e essa classificação está relacionada com as apresentações clínicas, microbiologia, fatores do hospedeiro e resposta ao tratamento (WORKOWSKI *et al.*, 2021). A CVV não complicada está associada a mulheres imunocompetentes, frequentemente causada por *C. albicans*. Já a CVV complicada, na maioria das vezes, é causada por outras espécies de *Candida* e está relacionada a mulheres com diabetes, HIV, uso de corticosteroides, além de outras condições de imunodeficiência (SOBEL *et al.*, 1996).

O diagnóstico da CVV não-complicada envolve a avaliação dos sintomas e a observação de leveduras em brotamento, hifas e pseudohifas no exame direto à fresco com 10% de hidróxido de potássio. O padrão ouro para o diagnóstico é a cultura, que permite a identificação das leveduras patogênicas. Ressalta-se que o crescimento de *Candida* spp. em meios de cultura, mas ausência de sintomas, sugere a presença de *Candida* como um comensal.

Aproximadamente 15% das mulheres que desenvolvem essa infecção terão a forma complicada, exigindo diagnóstico específico, como cultura e PCR, para identificação da espécie (CDC, 2021). Além disso, é crucial determinar o perfil de suscetibilidade aos antifúngicos, caso os sintomas persistam após o tratamento (WORKOWSKI *et al.*, 2021).

O tratamento da CVV é regido por imidazóis, que podem ser administrados por via tópica ou oral. O tratamento oral mais utilizado é o fluconazol, o qual recebeu a aprovação do FDA em 1990. O mecanismo de ação consiste no bloqueio da conversão do lanosterol em ergosterol, levando à ruptura da membrana celular fúngica. Efeitos adversos associados a este tratamento incluem sintomas gastrointestinais, elevações nos parâmetros bioquímicos hepáticos, erupção cutânea, entre outros (PASKO *et al.*, 1990). O fluconazol é amplamente utilizado e de primeira escolha devido à sua eficácia, segurança e à disponibilidade de versões genéricas do medicamento (SOBEL *et al.*, 2018). É importante ressaltar que a testagem da suscetibilidade aos fármacos antifúngicos é de suma importância para a escolha do tratamento farmacológico, sendo ainda mais importante em mulheres que apresentam CVV refratária (NYIRJESY *et al.*, 2022).

Até 2012, poucos casos de *C. albicans* resistentes eram reportados, a resistência era mais comumente associada a espécies de *Candida* não-*albicans*, como *C. glabrata* e *C. krusei* (SOBEL *et al.*, 1996; SOBEL *et al.*, 2018). Mas em 2012, foram descritos 25 casos de *C. albicans* resistentes ao fluconazol em Detroit, EUA (MARCHAIM *et al.*, 2012). O número de isolados resistentes ao fluconazol têm aumentado nos últimos anos, isso pode estar associado com a atividade fungistática deste fármaco. Portanto, o tratamento a longo prazo com fluconazol não é recomendado, principalmente devido ao potencial de desenvolvimento de resistência por *C. albicans* (BAUTERS *et al.*, 2022; LU *et al.*, 2021). No entanto, na prática clínica observa-se com frequência casos recorrentes, o que pode resultar em tratamentos prolongados com fluconazol, contribuindo para o aumento observado nos últimos anos no número de isolados de *C. albicans* resistentes ao azóis (MARCHAIM *et al.*, 2012).

A resistência de *C. albicans* ao fluconazol pode ocorrer devido a mutação de genes ERG11, o qual está relacionado a enzima alvo do fármaco, 14  $\alpha$ -dimetilase responsável pela produção de ergosterol (SOBEL *et al.*, 2018). Outro mecanismo de resistência é a superexpressão de bombas de efluxo na membrana celular fúngica. Essas estruturas expulsam os fármacos para a zona extracelular impedindo seu acúmulo e sua ação (PEREIRA *et al.*, 2021). As complicações decorrentes do tratamento ineficaz ou da ausência deste são doença inflamatória pélvica, distúrbios menstruais, infertilidade, gravidez ectópica, aborto espontâneo

e aumento da suscetibilidade ao HIV (YANO *et al.*, 2019). Como novas estratégias para o tratamento da CVV estão oteseconazol, ibrexafungerp, e voriconazol, entretanto mais estudos de eficácia são necessários, além de novas abordagens terapêuticas (SATORA *et al.*, 2023).

Os fatores de virulência de *C. albicans* englobam a transição de levedura para hifa, expressão de adesinas e invasinas na superfície celular, biofilme, secreção de enzimas hidrolíticas e mudança fenotípica. Esses fatores conferem a habilidade de infectar diversos compartimentos do hospedeiro, a permanência do fungo no hospedeiro e a patogenicidade da doença (NICHOLLS *et al.*, 2011).

A produção de enzimas hidrolíticas possibilita a obtenção de nutrientes, invasão celular e evasão do sistema imunológico (STANISZEWSKA *et al.*, 2012). A transição morfológica de forma leveduriforme para forma filamentosa confere à espécie uma maior capacidade de sobreviver e evadir o sistema imunológico do hospedeiro. Isso ocorre porque impede a fagocitose por macrófagos e, adicionalmente, destrói essas células de defesa, desempenhando assim um papel vital na virulência deste fungo (VILLA *et al.*, 2020). Este fenômeno é reversível e responde a sinais externos, como temperatura, pH, disponibilidade de oxigênio, privação de nutrientes e presença de soro.

As hifas são as formas relacionadas à invasão celular, pela produção de enzimas proteolíticas e destruição do tecido, enquanto as formas leveduriformes permanecem na superfície das células epiteliais, sendo associadas à colonização e disseminação no hospedeiro (SCHERWITZ, 1982; RAY e PAYNE, 1988; CZECHOWICZ *et al.*, 2022). Um estudo demonstrou que mutantes de *C. albicans* incapazes de invadir células epiteliais *in vitro* apresentam uma redução na virulência em modelos animais *in vivo* (NOBILE *et al.*, 2008). Candilicina é um peptídeo que tem sido considerado o fator chave para o dano celular nas células vaginais causado pelo fungo *C. albicans*. Essa toxina é produzida pelas hifas e tem sido associada à invasão e penetração acentuada nos tecidos (CZECHOWICZ *et al.*, 2022). Além disso, esse peptídeo é um fator hemolítico, conferindo para *C. albicans* capacidade de romper eritrócitos. A hemólise é neutralizada pelo antagonista receptor purinérgico pirodoxal-fosfato-6-azofenil-2,4-dissulfônico (MOGAVERO *et al.* 2022).

O biofilme formado por *C. albicans* pode se aderir em superfícies abióticas (como catéter e próteses dentárias) ou bióticas (tecidos do hospedeiro, como trato gastrointestinal e vaginal) (NETT e ANDES, 2006). O biofilme *in vivo* tem uma estrutura desorganizada onde

blastocónídeos se associam aleatoriamente com hifas, e ainda, adiciona à matriz eritrócitos, plaquetas, neutrófilos, macrófagos e outras células do hospedeiro (GANGULY e MITCHELL, 2011). Além disso, moléculas de *quorum sensing*, como farnesol e dodecanol, liberadas pelas células fúngicas, atuam no aprimoramento do biofilme, regulando a expressão de genes responsáveis por eventos dentro do biofilme, como crescimento, desprendimento (disseminação das células fúngicas), resistência e/ou patogenicidade (WILLIAMS *et al.*, 2011; BRAND, 2012). Proteases desempenham papéis importantes nas células que estão no biofilme, com uma maior capacidade de dispersão e adesão em outros compartimentos (PEREIRA *et al.*, 2021). Ainda, essas estruturas são altamente resistentes e impermeáveis a diversas substâncias, como medicamentos antifúngicos, e isso pode explicar a ineficácia do tratamento (CZECHOWICZ *et al.*, 2022).

A resistência inerente ao fluconazol conferido pelo biofilme está relacionada com a superexpressão das bombas de efluxo, a presença da matriz extracelular e a presença de células persistentes (ANDERSON *et al.*, 2005; COWEN *et al.*, 2008) As bombas de efluxo são expressas no biofilme mesmo na ausência dos medicamentos antifúngicos, diferentemente das bombas presentes nas células planctônicas. A matriz extracelular atua como uma barreira física para a penetração de fármacos, além de conferir a integridade da estrutura do biofilme. As células persistentes são uma subpopulação metabolicamente dormentes que surgem de forma aleatória no biofilme, são extremamente resistentes aos antifúngicos (PEREIRA *et al.*, 2021; NOBILE e JOHNSON *et al.*, 2015). Um estudo demonstrou que essas células persistentes têm a sobrevivência facilitada em condições de estresse, como em concentrações mais altas que a MIC, devido a um mecanismo denominado resposta ao estresse da montagem do ribossomo (RASTR) (DUMEAUX *et al.*, 2023).

### **3. Eubiose versus Disbiose**

A eubiose é caracterizada pelo equilíbrio dos microrganismos da microbiota humana, estabelecendo uma relação de cooperação com as células do hospedeiro. A microbiota vaginal é predominantemente composta por espécies de *Lactobacillus*, uma bactéria Gram-positiva anaeróbia facultativa reconhecida por sua capacidade de produzir ácido lático, que mantém um pH ácido na vagina, constituindo a primeira linha de defesa frente a patógenos oportunistas (HAMMES *et al.*, 2006; KALIA *et al.*, 2020). Além disso, o gênero *Lactobacillus* spp. também produz bacteriocinas, que exibem atividade bactericida, inibindo o crescimento de algumas bactérias, como *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* (STOYANCHEVA *et al.*, 2014). Outra

substância produzida por *Lactobacillus* spp. é o peróxido de hidrogênio, cuja função ainda não está totalmente estabelecida, alguns estudos sugerem que pode ser prejudicial para *Lactobacillus* abundantes na eubiose, enquanto benéfico para bactérias associadas à disbiose, outros estudos sugerem o contrário (BORIS *et al.*, 2000; GONG *et al.*, 2014).

Técnicas moleculares permitiram a divisão da microbiota vaginal das mulheres em sete tipo de comunidades estabelecidas, com base na composição e abundância das espécies bacterianas. Essas comunidades são denominadas como CSTs (*Community State Types*), onde CST-I é dominada por *L. crispatus*, CST-II por *L. gasseri*, CST-III por *L. iners*, CST-IV por bactérias anaeróbias, CST-V por *L. jensenii*. O quarto grupo é dividido em 3 subgrupos, sendo dominado principalmente por bactérias anaeróbias associadas a vaginose bacteriana como *Prevotella bivia*, *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* (RAVEL *et al.*, 2011; GAJER *et al.*, 2012; FRANCE *et al.*, 2020). Em uma condição disbiótica, a microbiota é mais diversificada e dominada por essas bactérias associadas à VB (COUDRAY e MADHIVANAN, 2020). Cerca de 24% das mulheres apresentam essa condição, muitas das quais podem não apresentar sintomas, embora possa estar relacionada com problemas de concepção e complicações na gravidez (HAAHR *et al.*, 2019; PEEBLES *et al.*, 2019).

A disbiose está associada a patógenos oportunistas, como algumas espécies de *Candida*, um fungo dimórfico, apresentando duas formas celulares que podem ocorrer em condições tanto de eubiose quanto de disbiose. A forma leveduriforme é encontrada em mulheres saudáveis, enquanto a forma filamentosa está ligada à CVV (SOBEL, 1989). Para que a infecção ocorra, é necessário regulação da expressão de genes envolvidos com a transição de levedura para hifa, seguida pela proliferação e maturação das células fúngicas. Nesse momento células inflamatórias são recrutadas, surgindo os sintomas vaginais, como irritação, prurido, queimação e corrimento branco, e um pH vaginal próximo a 4,5 (KALIA *et al.*, 2020).

Outro microrganismo associado à disbiose é *Trichomonas vaginalis*. O mecanismo da patogênese da tricomoníase envolve primeiramente a aderência da forma ameboide do trofozoíto nas células epiteliais vaginais, seguida pela evasão do sistema imune, proliferação do parasito, fagocitose de *Lactobacillus* e um aumento do pH vaginal (maior que 4,5) (RANDON-MALDONADO *et al.*, 1998; PETRIN *et al.*, 1998; BENCHIMOL, 2004). O protozoário *T. vaginalis* está ligado com a CST-IV da microbiota vaginal, que inclui bactérias anaeróbias e baixos níveis de *Lactobacillus* (BROTMAN *et al.*, 2012).

#### 4. Infecções mistas

A VB pode coexistir com a CVV, resultando em problemas reprodutivos se não for tratada, podendo levar à infertilidade. Além disso, essa coinfeção pode resultar em infecções secundárias, como a tricomoníase. O ambiente disbiótico, caracterizado por baixas densidades de *Lactobacillus* e uma microbiota diversa, predispõe infecções oportunistas e sexualmente transmissíveis, as quais podem estar associadas a infecções mistas e coinfeções, uma condição em que mais de um microrganismo contribui para os sintomas. Isso ocorre porque as condições do ambiente vaginal necessárias para o desenvolvimento da VB são as mesmas para a transição de levedura para hifa de *C. albicans* e para a patogênese da tricomoníase (GALLO *et al.*, 2012; KALIA *et al.*, 2015; VAN OOSTRUM *et al.*, 2013).

A coinfeção desses microrganismos pode ser explicada pela existência de vias compartilhadas que servem como elos moleculares entre as infecções. As galectinas podem estar associadas a isso, pois são proteínas de ligação que facilitam a adesão e invasão celular de *T. vaginalis* e *C. albicans*, por exemplo. Um estudo realizado em Granada, no período de 2011 a 2014, estimou uma prevalência de 22% de coinfeção por *T. vaginalis* e *Gardenerella vaginalis*, e 5% da coinfeção de *T. vaginalis* e *C. albicans*. A ocorrência dos três patógenos juntos teve uma prevalência de 2% (CARRILLO-ÁVILA *et al.*, 2017). Em outro estudo, a prevalência da coinfeção por *T. vaginalis* e *C. albicans* foi estimada em 15%, associada à presença de dor nas pacientes (LOPEZ-MONTEON *et al.*, 2013).

O diagnóstico laboratorial nesses casos é de extrema importância, e estratégias que permitam a detecção simultânea desses agentes etiológicos devem ser priorizadas, especialmente técnicas de biologia molecular. Um estudo conduzido na Índia comparou o método de análise de sinais e sintomas e sua correlação com diferentes infecções e agente etiológicos, e técnicas de PCR. Este estudo evidenciou uma redução na detecção dos agentes etiológicos testados nesse estudo pelo PCR, demonstrando que os sinais e sintomas foram relacionados erroneamente com as infecções. Aproximadamente 85% das pacientes foram submetidas a tratamentos desnecessários devido ao diagnóstico clínico restrito, baseado exclusivamente nos sintomas (SONKAR *et al.*, 2016).



**OBJETIVOS**

## **Objetivo Geral**

O objetivo geral desta dissertação de mestrado foi padronizar a co-cultura de *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans* e *Lactobacillus crispatus*, visando desenvolver uma ferramenta para caracterizar a atividade antimicrobiana de novos potenciais fármacos. Essa ferramenta permitirá direcionar apenas as moléculas mais promissoras para estudos em modelos animais e clínicos. Além disso, o objetivo foi utilizar a co-cultura para avaliar as interações entre os microrganismos e como os fatores de virulência de *T. vaginalis* e *C. albicans* são influenciados por essas interações.

## **Objetivos Específicos**

1. Revisar as técnicas de co-cultura e co-incubação utilizadas para avaliação das interações entre *T. vaginalis* ou *Candida* spp. com *Lactobacillus* spp., e/ou células vaginais;
2. Padronizar a co-cultura de *T. vaginalis*, *C. albicans* e *L. crispatus*;
3. Avaliar a suscetibilidade dos microrganismos em co-cultura aos fármacos utilizados de primeira escolha para tricomoníase e candidíase;
4. Avaliar o efeito das interações entre os microrganismos em co-cultura com as células epiteliais vaginais e eritrócitos;
5. Avaliar o efeito das interações entre os microrganismos na co-cultura na formação e na viabilidade do biofilme;
6. Avaliar o efeito das interações entre os microrganismos no processo de transformação de levedura para hifa.

**CAPÍTULO I: Cardoso, Fernanda Gomes; Tasca, Tiana.**  
**Advancements in Vaginal Microbiota, *Trichomonas vaginalis*, and**  
**Vaginal cell**  
**Interactions: Insights from Co-culture Assays**

Manuscrito será submetido para o periódico *Microbes and Infection*

O texto completo do capítulo I, que no texto completo da dissertação defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as 44 - 75, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta da revisão de técnicas de co- cultura utilizadas para interação entre *Trichomonas vaginalis*, células vaginais, microbiota e patógenos.









































































**CAPÍTULO II: Cardoso, Fernanda Gomes; Santos,  
Luisa Trindade; Menezes, Saulo Almeida; Rigo,  
Graziela Vargas; Tasca, Tiana. *In vitro* Co-culture  
Model of *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans*,  
and *Lactobacillus crispatus*: A Tool for Assessing  
Antimicrobial Activity and Microorganism  
Interactions in Vaginitis**

Manuscrito será submetido para o periódico

*European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*

O texto completo do capítulo II, que no texto completo da dissertação defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as 78 - 119, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta da descrição da padronização da co-cultura de *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans* e *Lactobacillus crispatus*.

































































































**DISCUSSÃO GERAL**

O microbioma humano engloba os microrganismos da microbiota, seus genes e suas interações com o ambiente. Cerca de 9% do microbioma humano total é constituído pelo microbioma vaginal, responsável pela fisiologia do ambiente vaginal e intimamente ligado com o sucesso reprodutivo (GRICE e SEGRE, 2012; SIROTA *et al.*, 2014). A eubiose é a relação simbiótica entre a microbiota e o corpo humano, geralmente relacionada com espécies de *Lactobacillus*. Em menor quantidade, outros microrganismos também estão presentes. Entretanto, fatores como *status* gestacional, ciclo menstrual, atividade sexual, idade e uso de contraceptivos interferem na dinâmica da microbiota, modificando composição microbiana (SARAF *et al.* 2021).

A disbiose é caracterizada pela diminuição na quantidade de espécies de *Lactobacillus* dando espaço para uma variedade de microrganismos, como *Gardenerella vaginalis*, *Candida* spp., estreptococos, estafilococos, enterobactérias e *Trichomonas vaginalis* (VAN DE WIJGERT *et al.* 2017). A disbiose vaginal afeta mulheres em todo mundo, impactando negativamente a saúde vaginal ao aumentar as chances de doenças inflamatórias e metabólicas (PANDA *et al.* 2014). Essa condição pode ser de causa fisiológica, como gravidez e ciclo menstrual, ou patológica, como vaginose bacteriana (VB), infecções do trato urinário e infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) (LAMONT *et al.*, 2011).

*Trichomonas vaginalis*, um protozoário flagelado, é o agente etiológico da tricomoníase, uma IST frequentemente associada a uma microbiota disbiótica, predominantemente composta por bactérias anaeróbias. Essas bactérias podem atuar como patobiontes, intensificando os efeitos patogênicos do parasito. (HIDERFELD *et al.*, 2020). A fagocitose é um importante mecanismo de sobrevivência do protozoário no ambiente vaginal, diminuindo a quantidade de *Lactobacillus* e, conseqüentemente, a proteção conferida por essas bactérias, e pode estar associada a elevação do pH vaginal (KALIA *et al.*, 2020). Um pH elevado e a redução *Lactobacillus* também estão relacionados com a candidíase vulvovaginal (CVV), uma infecção oportunista principalmente causada por *Candida albicans*, um fungo dimórfico (ANDERSON *et al.*, 2004). Essa infecção caracteriza-se pelo excessivo crescimento de espécies de *Candida*, tendo o envolvimento de processos relacionados com a sua patogênese, como aderência, invasão a células epiteliais, transição morfológica para a forma micelial patogênica, formação de biofilme, e secreção de fatores de virulência (SOBEL *et al.*, 1989b). A coexistência dessas doenças em mulheres é um problema significativo para a saúde vaginal, porém pouco documentada, pois trata-se de um conjunto de doenças de notificação não compulsória. Além disso, o diagnóstico pouco sensível que não leva em consideração esses dois agentes etiológicos e a falta de testagem dos isolados

resistentes ao tratamento resultam em um tratamento inadequado e casos reinfecções (MARCHAIM *et al.*, 2012; SONKAR *et al.*, 2016; VAN GERWEN *et al.*, 2021).

Além das condições do microambiente vaginal, outros mecanismos podem explicar a coexistência dessas infecções. Por exemplo, diversos membros da família de galectinas desempenham funções na interação entre hospedeiro e patógeno, podendo estar associados tanto ao aumento quanto à diminuição da infectividade e patogenicidade da doença (LUJAN *et al.*, 2022). No caso de *T. vaginalis*, as galectinas aumentam a infectividade e patogenicidade; GAL-1 e GAL-3 são expressas nas células vaginais e cervicais, funcionando como receptores para o lipoglicanos presentes na superfície do trofozoíto (FICHOROVA *et al.*, 2016; NIO-KOBAYASHI, 2018). Em relação à infecção por *C. albicans*, GAL-3 pode ser liberada por neutrófilos, apresentando funções opostas: GAL-3 extracelular promove a fagocitose de células fúngicas pelos neutrófilos, enquanto GAL-3 intracelular inibe as ações fungicidas dos neutrófilos (LINDEN *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2017). Considerando as interações microbianas no ambiente vaginal, técnicas de co-cultura emergem com intuito de proporcionar interações que acontecem fisiológica ou patologicamente no corpo humano em um sistema *in vitro* (TEMKIN *et al.*, 2019).

Neste contexto, no capítulo I desta dissertação é apresentada uma visão atualizada sobre as técnicas de co-cultura e co-incubação e seus principais achados em relação a interação de *T. vaginalis*, *Candida* spp., *Lactobacillus* spp. com patógenos, microbiota vaginal, células vaginais e células do sistema imunológico. Com técnicas de co-incubação de *T. vaginalis* e células vaginais, é possível verificar como essas interações justificam os sintomas e complicações relacionados à doença, como infertilidade, associação da infecção com câncer cervical, doença inflamatória pélvica e problemas durante a gestação, como parto prematuro (VAN GERWEN *et al.*, 2021; EDWARDS *et al.*, 2016). A citotoxicidade causada pelo protozoário é um processo crucial para a aquisição de nutrientes e evasão do sistema imune (LENKER e ALDERETE, 2000). Estudos que avaliam essas relações mostram que *T. vaginalis* tem a capacidade de fagocitar pequenas partes celulares, possui estruturas de comunicação intracelular e pode sobreviver em ambientes de privação de nutrientes. Além disso, essa infecção tem um caráter inflamatório relacionado com a liberação de citocinas pró-inflamatórias (MIDDLEJ e BENCHIMOL 2010; NIEVAS *et al.*, 2018; SONG *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2019).

Ainda no capítulo I, observamos que com técnicas de co-cultura, também é possível verificar a capacidade de bactérias do gênero *Lactobacillus* de produzirem substâncias

antimicrobianas, reforçando a sua ligação com a saúde vaginal (SANTOS, 2019; NAVARRO, 2023). Entretanto, nem todas as espécies de *Lactobacillus* podem proteger o microambiente vaginal. Uma microbiota composta predominantemente por *L. iners* é associada a ISTs, vaginose bacteriana e efeitos adversos na gravidez, pois apresenta uma fraca atividade probiótica. *L. iners* não produz peróxido de hidrogênio e tem uma produção reduzida de ácido lático. Além disso, consegue se adaptar ao ambiente de estresse na presença de *T. vaginalis* (PETRICEVIC *et al.*, 2014; CHIU *et al.*, 2021, ZHENG *et al.*, 2021). As espécies de *Candida*, ao se encontrarem no ambiente vaginal, desenvolvem mecanismos para garantir a sua sobrevivência. Dessa forma, são capazes de tolerar condições de estresse causadas por *Lactobacillus*, alcalinizam o ambiente e seu biofilme pode servir como reservatório para patógenos (BEYER *et al.*, 2018, FILARDO *et al.*, 2019; SILAO *et al.*, 2024). Condições de privação de nutrientes, aumento do pH, temperatura próxima a 37°C e baixa densidade de células de *Candida* desempenham um papel crucial na formação de hifas, facilitando a aderência às células epiteliais, conseqüentemente, a subseqüente patogênese (BISWAS *et al.*, 2007; MAYER *et al.*, 2013).

De fato, o principal obstáculo para avaliação da relação da microbiota com patógenos é a falta de modelos animais e celulares capazes de representar fielmente o ambiente vaginal, considerando as ações das células imunes, a composição microbiana e as características fisiológicas do ambiente (FRANCE *et al.*, 2022). Neste contexto, modelos celulares avançados podem ser interessantes, como o modelo *organ-on-a-chip*, podem ser promissores. Esses modelos garantem o cultivo celular em uma geometria definida, reproduzem as condições do ambiente a ser mimetizado, permitem cultivos por longos períodos e possibilitam a integração de células imunes, a ação hormonal e a aplicação de forças mecânicas (ROTHBAUER *et al.*, 2018).

No capítulo II, estabelecemos uma co-cultura composta por *T. vaginalis*, *C. albicans*, *L. crispatus*, visando um microambiente experimental propício à interação e competição por nutrientes desses microrganismos. Verificamos que elevadas densidades de *L. crispatus* exerceram um efeito inibitório sobre o crescimento de *T. vaginalis* e *C. albicans*, inclusive impedindo a transição de *C. albicans* de sua forma leveduriforme para hifa. Esse fenômeno pode ser atribuído à predominância de *Lactobacillus* após 24 h de incubação, à competição nutricional e à produção de compostos antimicrobianos, como bacteriocinas e peróxido de hidrogênio (VALLOR *et al.*, 2001; STOYANCHEVA *et al.*, 2014; KALIA *et al.*, 2020). Além de fornecer *insights* sobre as interações microbianas, a co-cultura serve como uma plataforma para avaliar a eficácia de compostos sintetizados ou produtos naturais visando novos tratamento para

tricomoníase candidíase vulvovaginal (CVV). Tendo em vista que, ao ajustar as densidades iniciais dos microrganismos para um nível ótimo, houve o equilíbrio nas interações favorecendo o crescimento de todos os microrganismos da co-cultura após o tempo de incubação.

A necessidade de novos agentes terapêuticos para tratamento dessas infecções é ressaltada pela frequente associação com isolados resistentes, acarretando custos substanciais para a saúde pública e impactando a qualidade de vida das mulheres no mundo todo. O desenvolvimento de medicamentos é um processo complexo e dispendioso, geralmente leva de 12 a 15 anos e custa mais de 1 bilhão de dólares (HUGHES *et al.*, 2010). A pesquisa básica é fundamental na identificação de alvos terapêuticos e seleção de candidatos a fármacos. Neste contexto, a pesquisa translacional visa aplicar os resultados da ciência básica em estudos em humanos. No entanto, há o "vale da morte" entre a pesquisa básica e as etapas clínicas no desenvolvimento de medicamentos, afetando a pesquisa translacional, especialmente para infecções negligenciadas e disseminadas (RUBIO *et al.*, 2010; RIGO *et al.*, 2022). Os nossos resultados revelaram uma redução de até quatro vezes no valor de MIC (Concentração Inibitória Mínima) do metronidazol frente ao isolado clínico fresco de *T. vaginalis* na co-cultura, comparativamente à monocultura. Essa observação pode ser atribuída à presença em maior densidade de *L. crispatus* quando o crescimento do protozoário foi inibido. Fichorova *et al.* (2013) demonstrou que *T. vaginalis* exibe interações antagônicas com *L. acidophilus*, *L. crispatus* e *L. jensenii* (FICHOROVA *et al.*, 2013). Além disso, a redução nos valores de MFC (Concentração Fungicida Mínima) de fluconazol para *C. albicans* em co-cultura, fenômeno que pode ser associado à atividade antimicrobiana de *L. crispatus* e à capacidade de *T. vaginalis* fagocitar as formas leveduriformes. Um estudo demonstrou que esse mecanismo é mediado por um receptor de manose localizado na superfície do parasito (PEREIRA-NEVES e BENCHIMOL, 2007). Esta redução nos valores de MIC e MFC em co-cultura sugere uma perspectiva promissora para a pesquisa translacional, uma vez que esse sistema reflete de forma mais precisa o microambiente dos modelos *in vivo* em comparação com monoculturas. Assim, além do efeito intrínseco dos potenciais fármacos testados, o contexto microbiano desempenha um papel crucial na inibição dos patógenos.



**CONCLUSÕES**

Os resultados obtidos nesta dissertação permitem concluir:

- (I) Foram estabelecidas as condições ótimas para co-cultura: meio de cultura MRS, tempo de incubação de 24 h e a densidade inicial de *Trichomonas vaginalis* foi de  $1,00 \times 10^6$  trofozoítos/mL, *Candida albicans* foi de  $3,33 \times 10^4$  UFC/mL e *Lactobacillus crispatus* foi de  $5,53 \times 10^6$  UFC/mL ou  $5,53 \times 10^7$  UFC/mL.
- (II) A co-cultura é um método eficiente para a avaliação da eficácia antimicrobiana de fármacos destinados ao tratamento da vaginite.
- (III) A co-cultura permite avaliar se o potencial fármaco é ativo contra o residente normal da microbiota vaginal, *Lactobacillus crispatus*.
- (IV) Os valores das concentrações inibitória (MIC, em inglês) e fungicida mínima (MFC, em inglês) foram menores em co-cultura quando comparados à monocultura.
- (V) A co-cultura elucida as interações entre os microrganismos.
- (VI) *L. crispatus* apresenta atividade antagônica contra *T. vaginalis* e *C. albicans*.
- (VII) A co-cultura aumentou a citotoxicidade do isolado ATCC 30236 de *Trichomonas vaginalis*.
- (VIII) A formação de biofilme e a transição de levedura para hifa de *Candida albicans* foram inibidas na co-cultura.





Esta dissertação tem como perspectivas, utilizar o sistema de co-cultura para:

- (I) Realizar a testagem de novas moléculas, naturais ou sintéticas.
- (II) Investigar os mecanismos de adesão em dispositivos médicos biofuncionalizados.
- (III) Avaliar as substâncias geradas por *Lactobacillus crispatus* no nosso sistema.
- (IV) Adicionar células do sistema imune, avaliando de há diferenças entre a monocultura e a co-cultura na liberação de citocinas e espécies reativas de oxigênio.
- (V) Examinar as interações entre os microrganismos a nível molecular, focando na avaliação de genes relacionados com a resistência e fatores de virulência.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AKIMOTO-GUNTHER, Luciene et al. Highlights regarding host predisposing factors to recurrent vulvovaginal candidiasis: chronic stress and reduced antioxidant capacity. **PLoS One**, v. 11, n. 7, p. e0158870, 2016.
- ALDERETE, J. F.; PEARLMAN, E. Pathogenic *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity to cell culture monolayers. **Sexually Transmitted Infections**, v. 60, n. 2, p. 99-105, 1984.
- ALVAREZ-SÁNCHEZ, María Elizbeth et al. Negative iron regulation of the CP65 cysteine proteinase cytotoxicity in *Trichomonas vaginalis*. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 14-15, p. 1597-1605, 2007.
- ANDERSON, James B. Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 7, p. 547-556, 2005.
- ANDERSON, Matthew R.; KLINK, Kathleen; COHRSEN, Andreas. Evaluation of vaginal complaints. **Jama**, v. 291, n. 11, p. 1368-1379, 2004.
- ARENDRUP, M.; HORN, T.; FRIMODT-MØLLER, N. In vivo pathogenicity of eight medically relevant *Candida* species in an animal model. **Infection**, v. 30, p. 286-291, 2002.
- ARROYO, R.; ENGBRING, J.; ALDERETE, J. F. Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. **Molecular microbiology**, v. 6, n. 7, p. 853-862, 1992.
- ARROYO, ROSSANA; ALDERETE, J. F. *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells. **Infection and immunity**, v. 57, n. 10, p. 2991-2997, 1989.
- BAUTERS, Tiene GM et al. Prevalence of vulvovaginal candidiasis and susceptibility to fluconazole in women. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 187, n. 3, p. 569-574, 2002.
- BENCHIMOL, Marlene. Trichomonads under microscopy. **Microscopy and microanalysis**, v. 10, n. 5, p. 528-550, 2004.
- BERI, Divya et al. Demonstration and characterization of cyst-like structures in the life cycle of *Trichomonas vaginalis*. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 9, p. 430, 2020.

BERMAN, Judith. Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. **Current opinion in microbiology**, v. 9, n. 6, p. 595-601, 2006.

BERNARDIS, Flavia et al. The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. **Infection and immunity**, v. 66, n. 7, p. 3317-3325, 1998.

BEYER, Reinhard et al. Competition of *Candida glabrata* against *Lactobacillus* is Hog1 dependent. **Cellular Microbiology**, v. 20, n. 12, p. e12943, 2018.

BISWAS, Subhrajit; VAN DIJCK, Patrick; DATTA, Asis. Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 71, n. 2, p. 348-376, 2007.

BLANKENSHIP, Jill R.; MITCHELL, Aaron P. How to build a biofilm: a fungal perspective. **Current opinion in microbiology**, v. 9, n. 6, p. 588-594, 2006.

BORIS, Soledad; BARBÉS, Covadonga. Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. **Microbes and infection**, v. 2, n. 5, p. 543-546, 2000.

BRADFORD, L. Latéy; RAVEL, Jacques. The vaginal mycobiome: A contemporary perspective on fungi in women's health and diseases. **Virulence**, v. 8, n. 3, p. 342-351, 2017.

BRAND, Alexandra et al. Hyphal growth in human fungal pathogens and its role in virulence. **International journal of microbiology**, v. 2012, 2012.

BROTMAN, Rebecca M. et al. Association between *Trichomonas vaginalis* and vaginal bacterial community composition among reproductive-age women. **Sexually transmitted diseases**, v. 39, n. 10, p. 807-812, 2012.

BROWN, Alistair JP et al. Stress responses in *Candida*. **Candida and Candidiasis**, p. 225-242, 2011.

BRUM VIEIRA, Patrícia et al. Natural and synthetic compound anti-*Trichomonas vaginalis*: an update review. **Parasitology research**, v. 114, p. 1249-1261, 2015.

CALDERONE, Richard A.; CLANCY, Cornelius J. (Ed.). **Candida and candidiasis**. American Society for Microbiology Press, 2011.

CARDOSO, Fernanda Gomes et al. From Wet Mount to Nucleic Acid Amplification Techniques: Current Diagnostic Methods and Future Perspectives Based on Patenting of New Assays, Stains, and Diagnostic Images for *Trichomonas vaginalis* Detection. **Venereology**, v. 3, n. 1, p. 35-50, 2024.

CARMO, Monique S. do et al. *Lactobacillus fermentum* ATCC 23271 displays in vitro inhibitory activities against *Candida* spp. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1722, 2016.

CARRILLO-ÁVILA, José Antonio et al. Prevalence and genetic diversity of *Trichomonas vaginalis* in the general population of Granada and co-infections with *Gardnerella vaginalis* and *Candida* species. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 1436-1442, 2017.

**Centers for Disease Control and Prevention**, 2017. Disponível em <<https://www.cdc.gov/dpdx/trichomoniasis/index.html>> Acesso em: 14.03.2024.

**Centers for Disease Control and Prevention**, 2021. Disponível em <<https://www.cdc.gov/std/treatment-guidelines/candidiasis.htm>> Acesso em: 22/03/2024

CHANDRA, Jyotsna et al. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 18, p. 5385-5394, 2001.

CHANOS, Panagiotis; MYGIND, Tina. Co-culture-inducible bacteriocin production in lactic acid bacteria. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 10, p. 4297-4308, 2016.

CHEN, Yi-Pei et al. A novel cadherin-like protein mediates adherence to and killing of host cells by the parasite *Trichomonas vaginalis*. **MBio**, v. 10, n. 3, p. 10.1128/mbio.00720-19, 2019.

CHIN, Voon Kin et al. Dissecting *Candida albicans* infection from the perspective of *C. albicans* virulence and omics approaches on host–pathogen interaction: a review. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 10, p. 1643, 2016.

CHIU, Shu-Fang et al. Vaginal microbiota of the sexually transmitted infections caused by *Chlamydia trachomatis* and *Trichomonas vaginalis* in women with vaginitis in Taiwan. **Microorganisms**, v. 9, n. 9, p. 1864, 2021.

COUDRAY, Makella S.; MADHIVANAN, Purnima. Bacterial vaginosis—A brief synopsis of the literature. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 245, p. 143-148, 2020.

COWEN, Leah E. The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 187-198, 2008.

CZECHOWICZ, Paulina; NOWICKA, Joanna; GOŚCINIAK, Grażyna. Virulence factors of *Candida* spp. and host immune response important in the pathogenesis of vulvovaginal candidiasis. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 11, p. 5895, 2022.

DAVID, Helma; SOLOMON, Adline Princy. Molecular association of *Candida albicans* and vulvovaginal candidiasis: focusing on a solution. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, 2023.

DENNING, David W. et al. Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review. **The Lancet infectious diseases**, v. 18, n. 11, p. e339-e347, 2018.

DÍAZ-NAVARRO, Marta et al. In vitro study to assess modulation of *Candida* biofilm by *Escherichia coli* from vaginal strains. **Biofilm**, v. 5, p. 100116, 2023.

DONDERS, Gilbert GG et al. Pathogenesis of abnormal vaginal bacterial flora. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 182, n. 4, p. 872-878, 2000.

DUMEAUX, Vanessa et al. *Candida albicans* exhibits heterogeneous and adaptive cytoprotective responses to antifungal compounds. **Elife**, v. 12, p. e81406, 2023.

DUNNE, Rebecca L. et al. Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. **Cell research**, v. 13, n. 4, p. 239-249, 2003.

EDWARDS, Thomas et al. *Trichomonas vaginalis*: Clinical relevance, pathogenicity and diagnosis. **Critical reviews in microbiology**, v. 42, n. 3, p. 406-417, 2016.

FARR, Alex et al. Guideline: vulvovaginal candidosis (AWMF 015/072, level S2k). **Mycoses**, v. 64, n. 6, p. 583-602, 2021.

FERNANDES, Ângela et al. Vulvovaginal candidiasis and asymptomatic vaginal colonization in Portugal: Epidemiology, risk factors and antifungal pattern. **Medical Mycology**, v. 60, n. 5, p. myac029, 2022.

FICHOROVA, Raina N. et al. The villain team-up or how *Trichomonas vaginalis* and bacterial vaginosis alter innate immunity in concert. **Sexually transmitted infections**, v. 89, n. 6, p. 460-466, 2013.

FICHOROVA, Raina N. et al. *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan exploits binding to galectin-1 and-3 to modulate epithelial immunity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 2, p. 998-1013, 2016.

FIGUEROA-ANGULO, Elisa E. et al. The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. **Microbes and infection**, v. 14, n. 15, p. 1411-1427, 2012.

FILARDO, Simone et al. Biofilm in genital ecosystem: a potential risk factor for *Chlamydia trachomatis* infection. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 2019, n. 1, p. 1672109, 2019.

FIORI, Pier Luigi et al. *Trichomonas vaginalis* haemolysis: evidence of functional pores formation on red cell membranes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 109, n. 1, p. 13-18, 1993.

FLANAGAN, Peter R. et al. The *Candida albicans* TOR-activating GTPases Gtr1 and Rhb1 coregulate starvation responses and biofilm formation. **Mosphere**, v. 2, n. 6, p. 10.1128/msphere.00477-17, 2017.

FRANCE, Michael et al. Towards a deeper understanding of the vaginal microbiota. **Nature microbiology**, v. 7, n. 3, p. 367-378, 2022.

FRANCE, Michael T. et al. VALENCIA: a nearest centroid classification method for vaginal microbial communities based on composition. **Microbiome**, v. 8, p. 1-15, 2020.

GAJER, Pawel et al. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. **Science translational medicine**, v. 4, n. 132, p. 132ra52-132ra52, 2012.



- GALLO, Maria F. et al. Bacterial vaginosis, gonorrhea, and chlamydial infection among women attending a sexually transmitted disease clinic: a longitudinal analysis of possible causal links. **Annals of epidemiology**, v. 22, n. 3, p. 213-220, 2012.
- GANGULY, Shantanu; MITCHELL, Aaron P. Mucosal biofilms of *Candida albicans*. **Current opinion in microbiology**, v. 14, n. 4, p. 380-385, 2011.
- GARCIA, Melissa C. et al. A role for amyloid in cell aggregation and biofilm formation. **PloS one**, v. 6, n. 3, p. e17632, 2011.
- GERKEN, Thomas A. Biophysical approaches to salivary mucin structure, conformation and dynamics. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 4, n. 3, p. 261-270, 1993.
- GILBERT, R. O. et al. Cytopathogenic effect of *Trichomonas vaginalis* on human vaginal epithelial cells cultured in vitro. **Infection and immunity**, v. 68, n. 7, p. 4200-4206, 2000.
- GONÇALVES, Bruna et al. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. **Critical reviews in microbiology**, v. 42, n. 6, p. 905-927, 2016.
- GONG, Zheng et al. Lactobacilli inactivate *Chlamydia trachomatis* through lactic acid but not H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **PloS one**, v. 9, n. 9, p. e107758, 2014.
- GREGORIO, Priscilla Romina et al. Biosurfactant from vaginal *Lactobacillus crispatus* BC1 as a promising agent to interfere with *Candida* adhesion. **Microbial cell factories**, v. 19, p. 1-16, 2020.
- GRICE, Elizabeth A.; SEGRE, Julia A. The human microbiome: our second genome. **Annual review of genomics and human genetics**, v. 13, p. 151-170, 2012.
- HAAHR, Thor et al. Reproductive outcome of patients undergoing in vitro fertilisation treatment and diagnosed with bacterial vaginosis or abnormal vaginal microbiota: a systematic PRISMA review and meta-analysis. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 126, n. 2, p. 200-207, 2019.
- HAMMES, WALTER P.; HERTEL, Christian. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. **The prokaryotes**, v. 4, p. 320-403, 2006.

- HARP, Djana F.; CHOWDHURY, Indrajit. Trichomoniasis: evaluation to execution. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 157, n. 1, p. 3-9, 2011.
- HIBBETT, David S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological research**, v. 111, n. 5, p. 509-547, 2007.
- HIRT, Robert P.; SHERRARD, Jackie. *Trichomonas vaginalis* origins, molecular pathobiology and clinical considerations. **Current opinion in infectious diseases**, v. 28, n. 1, p. 72-79, 2015.
- HONIGBERG, B. M. (Ed.). **Trichomonads parasitic in humans**. Springer Science & Business Media, 2012.
- HONIGBERG, B. M.; BRUGEROLLE, G. Structure. In: HONIGBERG, B. M. (Ed.). *Trichomonads Parasitic in Humans*. New York: Springer, p. 05-35, 1990.
- HONIGBERG, B. M.; KING, V. M. Structure of *Trichomonas vaginalis* Donne. **The Journal of parasitology**, p. 345-364, 1964.
- HROMATKA, Bethann S.; NOBLE, Suzanne M.; JOHNSON, Alexander D. Transcriptional response of *Candida albicans* to nitric oxide and the role of the YHB1 gene in nitrosative stress and virulence. **Molecular biology of the cell**, v. 16, n. 10, p. 4814-4826, 2005.
- HUGHES, James P. et al. Principles of early drug discovery. **British journal of pharmacology**, v. 162, n. 6, p. 1239-1249, 2011.
- HWANG, Cheol-Sang et al. Copper-and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. **Microbiology**, v. 148, n. 11, p. 3705-3713, 2002.
- ITAPARY DOS SANTOS, Camilla et al. Antifungal and antivirulence activity of vaginal *Lactobacillus* spp. products against *Candida* vaginal isolates. **Pathogens**, v. 8, n. 3, p. 150, 2019.
- KALIA, Namarta et al. Prevalence of vulvovaginal infections and species-specific distribution of vulvovaginal candidiasis in married women of north india. **Int J Curr Microbiol App Sci**, v. 4, n. 8, p. 253-66, 2015.

KALIA, Namarta; SINGH, Jatinder; KAUR, Manpreet. Microbiota in vaginal health and pathogenesis of recurrent vulvovaginal infections: a critical review. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 19, p. 1-19, 2020.

KISSINGER, Patricia et al. Early repeated infections with *Trichomonas vaginalis* among HIV-positive and HIV-negative women. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 7, p. 994-999, 2008.

KISSINGER, Patricia; ADAMSKI, Alys. Trichomoniasis and HIV interactions: a review. **Sexually transmitted infections**, v. 89, n. 6, p. 426-433, 2013.

KULDA, Jaroslav. Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. **International journal for parasitology**, v. 29, n. 2, p. 199-212, 1999.

Lai SK, Hida K, Shukair S, Wang YY, Figueiredo A, Cone R, Hope TJ, Hanes J. Human immunodeficiency virus type 1 is trapped by acidic but not by neutralized human cervicovaginal mucus. *J Virol*. 2009;83(21):11196–200.

LAI, Samuel K. et al. Human immunodeficiency virus type 1 is trapped by acidic but not by neutralized human cervicovaginal mucus. **Journal of virology**, v. 83, n. 21, p. 11196-11200, 2009.

LAMONT, Ronald F. et al. The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 118, n. 5, p. 533-549, 2011.

LARSEN, Bryan; MONIF, Gilles RG. Understanding the bacterial flora of the female genital tract. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 4, p. e69-e77, 2001.

LEDERMANN, Walter. Historia sucinta de *Candida albicans*, blanca pero no tanto. **Rev Chilena Infectol**, v. 34, n. 5, p. 429-30, 2017.

LEHKER, Michael W.; ALDERETE, John F. Biology of trichomonosis. **Current opinion in infectious diseases**, v. 13, n. 1, p. 37-45, 2000

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

LEITSCH, David; WILLIAMS, Catrin F.; HRDÝ, Ivan. Redox pathways as drug targets in microaerophilic parasites. **Trends in parasitology**, v. 34, n. 7, p. 576-589, 2018.

LEON, Ella M. et al. Prevalence and risk factors for vaginal *Candida* colonization in women with type 1 and type 2 diabetes. **BMC infectious diseases**, v. 2, p. 1-6, 2002.

LEWIS, Felicia MT et al. Incidence and prevalence of *Trichomonas vaginalis* infection among persons aged 15 to 59 years: United States, 2018. **Sexually transmitted diseases**, v. 48, n. 4, p. 232-237, 2021.

LINDEN, Jennifer R. et al. Galectin-3 plays an important role in protection against disseminated candidiasis. **Medical Mycology**, v. 51, n. 6, p. 641-651, 2013.

LÓPEZ-MONTEON, A. et al. Codetection of *Trichomonas vaginalis* and *Candida albicans* by PCR in urine samples in a low-risk population attended in a clinic first level in central Veracruz, Mexico. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

LÓPEZ-MONTEON, A. et al. Codetection of *Trichomonas vaginalis* and *Candida albicans* by PCR in urine samples in a low-risk population attended in a clinic first level in central Veracruz, Mexico. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

LORIAN, VICTOR. In vitro simulation of in vivo conditions: physical state of the culture medium. **Journal of clinical microbiology**, v. 27, n. 11, p. 2403-2406, 1989.

LU, Hui et al. *Candida albicans* targets that potentially synergize with fluconazole. **Critical reviews in microbiology**, v. 47, n. 3, p. 323-337, 2021.

LU, Yang et al. Synergistic regulation of hyphal elongation by hypoxia, CO<sub>2</sub>, and nutrient conditions controls the virulence of *Candida albicans*. **Cell host & microbe**, v. 14, n. 5, p. 499-509, 2013.

LUJAN, Agustin L. et al. Galectins as potential therapeutic targets in STIs in the female genital tract. **Nature Reviews Urology**, v. 19, n. 4, p. 240-252, 2022.

MACK, Stephen R.; MÜLLER, Miklós. End products of carbohydrate metabolism in *Trichomonas vaginalis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 67, n. 2, p. 213-216, 1980.

MAGNUS, Manya et al. *Trichomonas vaginalis* Among HIV-Infected Women: Are Immune Status or Protease Inhibitor Use Associated With Subsequent: T. vaginalis: Positivity?. **Sexually transmitted diseases**, v. 30, n. 11, p. 839-843, 2003.

MAKAROVA, Natalia et al. Topical tenofovir protects against vaginal simian HIV infection in macaques coinfecting with *Chlamydia trachomatis* and *Trichomonas vaginalis*. **AIDS**, v. 31, n. 6, p. 745-752, 2017.

MARCHAIM, Dror et al. Fluconazole-resistant *Candida albicans* vulvovaginitis. **Obstetrics & Gynecology**, v. 120, n. 6, p. 1407-1414, 2012.

MARTCHENKO, Mikhail et al. Superoxide dismutases in *Candida albicans*: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced SOD5 gene. **Molecular biology of the cell**, v. 15, n. 2, p. 456-467, 2004.

MARTIN, David H. et al. Unique vaginal microbiota that includes an unknown *Mycoplasma*-like organism is associated with *Trichomonas vaginalis* infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 207, n. 12, p. 1922-1931, 2013.

MASHA, Simon Chengo et al. *Trichomonas vaginalis* and HIV infection acquisition: a systematic review and meta-analysis. **Sexually transmitted infections**, v. 95, n. 1, p. 36-42, 2019.

MAYER, François L.; WILSON, Duncan; HUBE, Bernhard. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-128, 2013.

MCCANN, Malachy et al. Synthesis and X-ray crystal structure of [Ag (phenidio) 2] ClO 4 (phenidio= 1, 10-phenanthroline-5, 6-dione) and its effects on fungal and mammalian cells. **Biometals**, v. 17, p. 635-645, 2004.

MCCLELLAND, R. Scott. *Trichomonas vaginalis* infection: can we afford to do nothing?. **The journal of infectious diseases**, v. 197, n. 4, p. 487-489, 2008.

MENEZES, Camila Braz; FRASSON, Amanda Piccoli; TASCA, Tiana. Trichomoniasis-are we giving the deserved attention to the most common non-viral sexually transmitted disease worldwide?. **Microbial cell**, v. 3, n. 9, p. 404, 2016.

- MIDDLEJ, V.; BENCHIMOL, M. *Trichomonas vaginalis* kills and eats—evidence for phagocytic activity as a cytopathic effect. **Parasitology**, v. 137, n. 1, p. 65-76, 2010.
- MILLER, Megan R.; NYIRJESY, Paul. Refractory trichomoniasis in HIV-positive and HIV-negative subjects. **Current infectious disease reports**, v. 13, p. 595-603, 2011.
- MIRAMÓN, Pedro; LORENZ, Michael C. A feast for *Candida*: metabolic plasticity confers an edge for virulence. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 2, p. e1006144, 2017.
- MOGAVERO, Selene et al. Candidalysin is the hemolytic factor of *Candida albicans*. **Toxins**, v. 14, n. 12, p. 874, 2022.
- MORENO-BRITO, Verónica et al. A *Trichomonas vaginalis* 120 kDa protein with identity to hydrogenosome pyruvate: ferredoxin oxidoreductase is a surface adhesin induced by iron. **Cellular microbiology**, v. 7, n. 2, p. 245-258, 2005.
- MTSHALI, Andile et al. In vitro effect of 5-nitroimidazole drugs against *Trichomonas vaginalis* clinical isolates. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 4, p. e00912-22, 2022.
- MÜLLER, MIKLÓS; LOSSICK, JOSEPH G.; GORRELL, THOMAS E. In vitro susceptibility of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole and treatment outcome in vaginal trichomoniasis. **Sexually transmitted diseases**, v. 15, n. 1, p. 17-24, 1988.
- MUZNY, Christina A.; VAN GERWEN, Olivia T. Secnidazole for trichomoniasis in women and men. **Sexual Medicine Reviews**, v. 10, n. 2, p. 255-262, 2022.
- NETT, Jeniel; ANDES, David. *Candida albicans* biofilm development, modeling a host–pathogen interaction. **Current opinion in microbiology**, v. 9, n. 4, p. 340-345, 2006.
- NICHOLLS, Susan et al. Activation of the heat shock transcription factor Hsf1 is essential for the full virulence of the fungal pathogen *Candida albicans*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, n. 3, p. 297-305, 2011.
- NIELSEN, MORTEN H.; NIELSEN, RUTH. Electron microscopy of *Trichomonas vaginalis* Donne: interaction with vaginal epithelium in human trichomoniasis. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology**, v. 83, n. 4, p. 305-320, 1975.

NIEVAS, Yesica R. et al. Membrane-shed vesicles from the parasite *Trichomonas vaginalis*: characterization and their association with cell interaction. **Cellular and molecular life sciences**, v. 75, p. 2211-2226, 2018.

NIO-KOBAYASHI, Junko. Histological mapping and subtype-specific functions of galectins in health and disease. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, v. 30, n. 172, p. SE89-SE96, 2018.

NOBILE, Clarissa J. et al. *Candida albicans* transcription factor Rim101 mediates pathogenic interactions through cell wall functions. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 11, p. 2180-2196, 2008.

NOBILE, Clarissa J.; JOHNSON, Alexander D. *Candida albicans* biofilms and human disease. **Annual review of microbiology**, v. 69, p. 71-92, 2015.

NYIRJESY, Paul et al. Vulvovaginal candidiasis: a review of the evidence for the 2021 Centers for Disease Control and Prevention of Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines. **Clinical Infectious Diseases**, v. 74, n. Supplement\_2, p. S162-S168, 2022.

OTOO-ANNAN, Emmanuel; SENOO-DOGBEY, Vivian Efua. Recurrent Vulvovaginal Candidiasis: Assessing the relationship between feminine/vaginal washes and other factors among Ghanaian women. **BMC Public Health**, v. 24, n. 1, p. 100, 2024.

PANDA, Suchita; GUARNER, Francisco; MANICHANH, Chaysavanh. Structure and functions of the gut microbiome. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)**, v. 14, n. 4, p. 290-299, 2014.

PASKO, Mary T.; PISCITELLI, Stephen C.; VAN SLOOTEN, Andrea D. Fluconazole: a new triazole antifungal agent. **Dicp**, v. 24, n. 9, p. 860-867, 1990.

PEEBLES, Kathryn et al. High global burden and costs of bacterial vaginosis: a systematic review and meta-analysis. **Sexually transmitted diseases**, v. 46, n. 5, p. 304-311, 2019.

PEREIRA, R. et al. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. **Journal of Applied Microbiology**, v. 131, n. 1, p. 11-22, 2021.

- PEREIRA-NEVES, Antonio; BENCHIMOL, Marlene. Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*: new insights. **Biology of the Cell**, v. 99, n. 2, p. 87-101, 2007.
- PETERS, Brian M. et al. Fungal morphogenetic pathways are required for the hallmark inflammatory response during *Candida albicans* vaginitis. **Infection and immunity**, v. 82, n. 2, p. 532-543, 2014.
- PETRICEVIC, Ljubomir et al. Characterisation of the vaginal *Lactobacillus* microbiota associated with preterm delivery. **Scientific reports**, v. 4, n. 1, p. 5136, 2014.
- PETRIN, Dino et al. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 2, p. 300-317, 1998.
- POOLE, Danielle N.; MCCLELLAND, R. Scott. Global epidemiology of *Trichomonas vaginalis*. **Sexually transmitted infections**, v. 89, n. 6, p. 418-422, 2013.
- POWELL, Anna M.; NYIRJESY, Paul. Recurrent vulvovaginitis. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 28, n. 7, p. 967-976, 2014.
- RAVEL, Jacques et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. supplement\_1, p. 4680-4687, 2011.
- RAY, Thomas L.; PAYNE, Candia D. Scanning electron microscopy of epidermal adherence and cavitation in murine candidiasis: a role for *Candida* acid proteinase. **Infection and immunity**, v. 56, n. 8, p. 1942-1949, 1988.
- RENDÓN-MALDONADO, José G. et al. *Trichomonas vaginalis*: in vitro phagocytosis of lactobacilli, vaginal epithelial cells, leukocytes, and erythrocytes. **Experimental parasitology**, v. 89, n. 2, p. 241-250, 1998.
- RICHARDSON, Jonathan P. et al. Candidalysin drives epithelial signaling, neutrophil recruitment, and immunopathology at the vaginal mucosa. **Infection and immunity**, v. 86, n. 2, p. 10.1128/iai.00645-17, 2018.
- RIGGSBY, W. Stuart et al. DNA content, kinetic complexity, and the ploidy question in *Candida albicans*. **Molecular and Cellular Biology**, 1982.



- RIGO, Graziela V. et al. Antimicrobial and Antibiofilm Activities of Copper (II)-1, 10-phenanthroline-5, 6-pione Against Commensal Bacteria and Fungi Responsible for Vaginal Microbiota Dysbiosis. **Current Microbiology**, v. 80, n. 12, p. 383, 2023.
- RIGO, Graziela V.; TASCA, Tiana. Vaginitis: review on drug resistance. **Current Drug Targets**, v. 21, n. 16, p. 1672-1686, 2020.
- RIGO, Graziela Vargas et al. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of 1, 10-phenanthroline-5, 6-dione-based metallodrugs and synergistic effect with metronidazole. **Parasitology**, v. 146, n. 9, p. 1179-1183, 2019.
- RIGO, Graziela Vargas et al. Novel treatment approaches to combat trichomoniasis, a neglected and sexually transmitted infection caused by *Trichomonas vaginalis*: Translational perspectives. **Venereology**, v. 1, n. 1, p. 47-80, 2022.
- ROSELLETTI, Elena et al. Vaginal epithelial cells discriminate between yeast and hyphae of *Candida albicans* in women who are colonized or have vaginal candidiasis. **The Journal of infectious diseases**, v. 220, n. 10, p. 1645-1654, 2019.
- ROTHBAUER, Mario; ZIRATH, Helene; ERTL, Peter. Recent advances in microfluidic technologies for cell-to-cell interaction studies. **Lab on a Chip**, v. 18, n. 2, p. 249-270, 2018.
- ROWLEY, Jane et al. Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates, 2016. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 97, n. 8, p. 548, 2019.
- RUBIO, Doris McGartland et al. Defining translational research: implications for training. **Academic Medicine**, v. 85, n. 3, p. 470-475, 2010.
- SARAF, Viqar Sayeed et al. Vaginal microbiome: normalcy vs dysbiosis. **Archives of microbiology**, v. 203, p. 3793-3802, 2021.
- SATORA, Małgorzata et al. Treatment of Vulvovaginal Candidiasis—An Overview of Guidelines and the Latest Treatment Methods. **Journal of clinical medicine**, v. 12, n. 16, p. 5376, 2023.

- SCHERWITZ, Christian. Ultrastructure of human cutaneous candidosis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, n. 3, p. 200-205, 1982.
- SCHWEBKE, Jane R.; BARRIENTES, Frank J. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* isolates with resistance to metronidazole and tinidazole. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 12, p. 4209-4210, 2006.
- SCHWEBKE, Jane R.; BURGESS, Donald. Trichomoniasis. **Clinical microbiology reviews**, v. 17, n. 4, p. 794-803, 2004.
- SECOR, W. Evan et al. Neglected parasitic infections in the United States: trichomoniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 90, n. 5, p. 800, 2014.
- SIROTA, Ido; ZAREK, Shvetha M.; SEGARS, James H. Potential influence of the microbiome on infertility and assisted reproductive technology. In: **Seminars in reproductive medicine**. Thieme Medical Publishers, 2014. p. 035-042.
- SOBEL, J. D. Pathophysiology of vulvovaginal candidiasis. **The Journal of Reproductive Medicine**, v. 34, n. 8 Suppl, p. 572-9; discussion 579, 1989.
- SOBEL, J. D.; SOBEL, R. Current treatment options for vulvovaginal candidiasis caused by azole-resistant *Candida* species. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 19, n. 9, p. 971-977, 2018.
- SOBEL, Jack D. Pathogenesis of *Candida* vulvovaginitis. **Current topics in medical mycology**, p. 86-108, 1989.
- SOBEL, Jack D.; VAZQUEZ, Jose A. Symptomatic vulvovaginitis due to fluconazole-resistant *Candida albicans* in a female who was not infected with human immunodeficiency virus. 1996. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, V. 22, n 4, p. 726–727.
- SONG, Hyun-Ouk et al. Delayed human neutrophil apoptosis by *Trichomonas vaginalis* lysate. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 48, n. 1, p. 1, 2010.
- SONKAR, Subash Chandra et al. Comparative analysis of syndromic and PCR-based diagnostic assay reveals misdiagnosis/overtreatment for trichomoniasis based on subjective judgment in symptomatic patients. **Infectious diseases of poverty**, v. 5, p. 1-10, 2016.

SORVILLO, F.; SMITH, L.; KERNDT, P.; ASH, L. *Trichomonas vaginalis*, HIV, and African-Americans. *Emerging Infection Disease*, v.7, n.6, p.927-32, 2001.

STANISZEWSKA, Monika et al. Role of aspartic proteinases in *Candida albicans* virulence. Part I. Substrate specificity of aspartic proteinases and *Candida albicans* pathogenesis. **Postępy Mikrobiologii**, v. 51, n. 2, 2012.

STOYANCHEVA, Galina et al. Bacteriocin production and gene sequencing analysis from vaginal *Lactobacillus* strains. **Archives of microbiology**, v. 196, p. 645-653, 2014.

SUTCLIFFE, S. Sexually transmitted infections and risk of prostate cancer: review of historical and emerging hypotheses. *Future Oncology*, v.6, n.8, p.1289-1311, 2010.

TEMKIN, Mia I. et al. High throughput co-culture assays for the investigation of microbial interactions. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 152, p. e60275, 2019.

TORRES-ROMERO, J. C.; ARROYO, R. Responsiveness of *Trichomonas vaginalis* to iron concentrations: evidence for a post-transcriptional iron regulation by an IRE/IRP-like system. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 6, p. 1065-1074, 2009.

VALENTI, Piera et al. Role of lactobacilli and lactoferrin in the mucosal cervicovaginal defense. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 338405, 2018.

VALLOR, Ana C. et al. Factors associated with acquisition of, or persistent colonization by, vaginal lactobacilli: role of hydrogen peroxide production. **The Journal of infectious diseases**, v. 184, n. 11, p. 1431-1436, 2001.

VAN DE WIJGERT, Janneke HHM; JESPERS, Vicky. The global health impact of vaginal dysbiosis. **Research in microbiology**, v. 168, n. 9-10, p. 859-864, 2017.

VAN GERWEN, Olivia T. et al. Epidemiology, natural history, diagnosis, and treatment of *Trichomonas vaginalis* in men. **Clinical Infectious Diseases**, v. 73, n. 6, p. 1119-1124, 2021.

VAN OOSTRUM, Noortje et al. Risks associated with bacterial vaginosis in infertility patients: a systematic review and meta-analysis. **Human reproduction**, v. 28, n. 7, p. 1809-1815, 2013.

VERSTREPEN, Kevin J.; KLIS, Frans M. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. **Molecular microbiology**, v. 60, n. 1, p. 5-15, 2006.

VILLA, Sonia et al. Transcriptional control of hyphal morphogenesis in *Candida albicans*. **FEMS yeast research**, v. 20, n. 1, p. foaa005, 2020.

VYLKOVA, Slavena et al. The fungal pathogen *Candida albicans* autoinduces hyphal morphogenesis by raising extracellular pH. **MBio**, v. 2, n. 3, p. 10.1128/mbio.00055-11, 2011.

WANG, Yan. Looking into *Candida albicans* infection, host response, and antifungal strategies. **Virulence**, v. 6, n. 4, p. 307-308, 2015.

WENDEL, Karen A.; WORKOWSKI, Kimberly A. Trichomoniasis: challenges to appropriate management. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. Supplement\_3, p. S123-S129, 2007.

WIGHTMAN, Raymond et al. In *Candida albicans*, the Nim1 kinases Gin4 and Hsl1 negatively regulate pseudohypha formation and Gin4 also controls septin organization. **The Journal of cell biology**, v. 164, n. 4, p. 581-591, 2004.

WILLEMS, Hubertine ME et al. Vulvovaginal candidiasis: a current understanding and burning questions. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 27, 2020.

WILLIAMS, Dustin L. et al. A modified CDC biofilm reactor to produce mature biofilms on the surface of PEEK membranes for an in vivo animal model application. **Current microbiology**, v. 62, p. 1657-1663, 2011.

WORKOWSKI, Kimberly A. Sexually transmitted infections treatment guidelines, 2021. **MMWR. Recommendations and Reports**, v. 70, 2021.

WU, Sheng-Yang et al. Cell intrinsic galectin-3 attenuates neutrophil ROS-dependent killing of *Candida* by modulating CR3 downstream Syk activation. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 48, 2017.

WYSONG, Deborah R. et al. Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. **Infection and immunity**, v. 66, n. 5, p. 1953-1961, 1998.

YANO, Junko et al. Current patient perspectives of vulvovaginal candidiasis: incidence, symptoms, management and post-treatment outcomes. **BMC women's health**, v. 19, p. 1-9, 2019.

ZHENG, Nengneng et al. Contribution of *Lactobacillus iners* to vaginal health and diseases: a systematic review. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, p. 792787, 2021.

ZHU, Weidong; FILLER, Scott G. Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. **Cellular microbiology**, v. 12, n. 3, p. 273-282, 2010.











Review

# From Wet Mount to Nucleic Acid Amplification Techniques: Current Diagnostic Methods and Future Perspectives Based on Patenting of New Assays, Stains, and Diagnostic Images for *Trichomonas vaginalis* Detection

Fernanda Gomes Cardoso, Mariana Dicki Freitas, Tiana Tasca and Graziela Vargas Rigo \*

Faculdade de Farmácia and Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre CEP 90610-000, Brazil; fe\_gcardoso@outlook.com (F.G.C.); marianadickifreitas@gmail.com (M.D.F.); tiana.tasca@ufrgs.br (T.T.)

\* Correspondence: grazivrgo@gmail.com

**Abstract:** Trichomoniasis is the most common non-viral sexually transmitted infection (STI) in the world. The estimated global prevalence in 2016 was 156 million adults aged 15–49. However, these data are underestimated, since the most used diagnostic method is the wet mount, which has low sensitivity, the information regarding the estimated duration of infection is limited and there is evidence of undiagnosed asymptomatic cases in both sexes. Currently 80% of cases—including both sexes—are asymptomatic, which makes the disease silent and chronic in course, leading to complications. The aim of this review was to discuss the diagnostic methods for *T. vaginalis* detection that are currently available and applicable in the clinical laboratory routine. Overall, nucleic acid amplification techniques are the best option for *T. vaginalis* detection, with higher sensitivity and specificity than other tests. Although these techniques present higher cost, their implementation should be supported to ensure correct trichomoniasis diagnosis and treatment beyond contributing to questions on epidemiology and control.

**Keywords:** *Trichomonas vaginalis*; trichomoniasis; diagnosis; nucleic acid amplification test (NAAT's)



Citation: Cardoso, F.G.; Freitas, M.D.; Tasca, T.; Rigo, G.V. From Wet Mount to Nucleic Acid Amplification Techniques: Current Diagnostic Methods and Future Perspectives Based on Patenting of New Assays, Stains, and Diagnostic Images for *Trichomonas vaginalis* Detection. *Venereology* 2024, 3, 35–50. <https://doi.org/10.3390/venereology3010004>

Academic Editor: Alessandro Russo

Received: 30 September 2023

Revised: 25 February 2024

Accepted: 4 March 2024

Published: 18 March 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Trichomoniasis is notably the most predominant non-viral sexually transmitted infection (STI) worldwide. In 2016, the World Health Organization (WHO) estimated 156 million cases of *Trichomonas vaginalis* infections worldwide, constituting almost half of the total global incidence of STIs among adults aged 15 to 49 years [1]. However, these data are underestimated because the most commonly used diagnostic method is the wet mount examination, which has variable sensitivity (50%), reaching 50% to 80% sensitivity in the absence or presence of *colpitis macularis* [2]. *T. vaginalis* can cause symptomatic infections in the vulvar and urethral areas of the genital tract. However, 80% of cases—including both sexes—are asymptomatic, which makes the disease silent and chronic, leading to complications such as pelvic inflammatory disease, cervical and prostate cancer, premature birth, and low birth weight in newborns [3,4]. The association of trichomoniasis with the increased transmission and acquisition of HIV/AIDS in a bidirectional relationship is well established, supporting the HIV epidemic in populations where trichomoniasis is endemic [5,6]. Trichomoniasis is currently treated with nitroimidazoles, mainly metronidazole, tinidazole, and secnidazole, which are approved by the Food and Drug Administration (FDA/USA) [7]. Although these are low-cost drugs and most cases are curable, approximately 2.0 to 28% are caused by drug-resistant *T. vaginalis* isolates, which contributes to therapy failures [8–10].

The impact of trichomoniasis on public health has become increasingly important and better understood, encompassing both the direct and indirect costs associated with

its treatment [11]. Data analyzed from 2016 to 2018 demonstrated a higher treatment cost for female patients (USD 220) than for male patients (USD 158), which is 70% higher than the costs reported in previous studies from 2001–2005 [12]. This increased cost can reach USD 167 million per year when comparing cases of HIV facilitated by the presence of the protozoan [13]. Therefore, accurate and early diagnosis is crucial for interrupting transmission and preventing complications associated with the infection. Trichomoniasis remains an underreported disease due to the inability to fulfill all the necessary criteria. The underreporting of cases, the occurrence of asymptomatic individuals, the increasing reports of *T. vaginalis* isolates resistant to nitroimidazoles, and the absence of public policies for prevention, detection, and treatment contribute to the lack of control of this STI. This situation will gradually become an unsustainable public health strategy. Efforts are needed to identify alternatives to mitigate the spread of trichomoniasis, along with attention towards and investment in diagnostic laboratory methods for detecting *T. vaginalis* and accessing qualified professionals to carry out an accurate diagnosis.

This review addresses laboratory diagnostic methods for *T. vaginalis* detection as well as an update on new methods that have been developed through patent filings around the world. The main methods currently available, described in Table 1, include: wet mount examination [14], cultural exam [15], staining [16], rapid tests [17,18], and molecular techniques based on nucleic acid amplification test (NAAT), such as conventional PCR [19,20], as well as other more recent tests for rapid identification that can often detect more than one sexually transmitted pathogen [21,22].

**Table 1.** Most common diagnostic methods for the detection of *T. vaginalis* approved by the Food and Drug Administration (FDA/USA) [7,18].

Assay	Equipment Requirements	Sample Type	Cost <sup>1</sup>	Relative Sensitivity <sup>2</sup>
Wet mount	Microscope	vaginal and endocervical swabs, urine sediment	\$	+
Staining method	Microscope	vaginal and endocervical swabs, urine sediment	\$	++
Culture	Incubator, microscope	vaginal and endocervical swabs, urine sediment	\$\$	++
Serology (antigen)—OSOM <sup>®</sup>	None	vaginal and endocervical swabs	\$\$	+++
Nucleic acid test (NAAT)—Affirm VPIII <sup>®</sup>	Affirm VPIII instrument	vaginal and endocervical swabs	\$\$	++
Nucleic acid test (NAAT)—Hologic Aptima TV <sup>®3</sup>	Tigris or Panther automated system	endocervical swabs, vaginal swabs, endocervical specimens collected in PreservCyt <sup>®</sup> (Thin Prep, Hologic Incorporated, MA, USA) solution and female urine specimens	\$\$\$	+++
Nucleic acid test—Solana Trichomonas Assay <sup>®</sup> (Quidel) <sup>4</sup>	Solana’s platform	vaginal swabs and urine specimens	\$\$	+++
Nucleic acid test (PCR) Max CTGCTV2 assay <sup>®</sup> (Becton Dickinson) <sup>5</sup>	Benchtop instrument, BD CTGCTV2	vaginal swab specimens and male or female urine specimens	\$\$\$	+++

Table 1. Cont.

Assay	Equipment Requirements	Sample Type	Cost <sup>1</sup>	Relative Sensitivity <sup>2</sup>
Nucleic acid test (PCR)—Cepheid <sup>®6</sup>	GeneXpert Instrument	Vaginal and endocervical swabs, female or male urine sediment	\$\$\$	+++
Nucleic acid test (PCR real time multiplex) The Allplex <sup>™</sup> STI Essential assay	Seegene <sup>®7</sup>	vaginal and endocervical swabs, urine sediment	\$\$\$	+++

**Legend:** <sup>1</sup>. The symbols represent different price ranges, \$—low cost; \$\$—intermediate cost; \$\$\$—high cost. <sup>2</sup>. The symbols indicate a range of sensitivity, +—low sensitivity; ++—intermediate sensitivity; +++—high sensitivity. <sup>3</sup>. Hologic, Inc., San diego, United States. <sup>4</sup>. Quidel Corporation, Ohio, United States. <sup>5</sup>. Becton Dickinson, New Jersey, United States. <sup>6</sup>. Cepheid, Sunnyvale, United States. <sup>7</sup>. Seegene, Inc., Seoul, Republic of Korea.

## 1. Methods

For this study, scientific databases such as Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>, accessed on 10 September 2023), Clinical Trials (<https://clinicaltrials.gov>, accessed on 22 September 2023), and various patent databases covering different regions, Europe (Espacenet, <https://worldwide.espacenet.com>, accessed on 22 September 2023), Brazil (INPI, <https://www.gov.br/inpi/pt-br>, accessed on 22 September 2023), Canada (CIPO, <https://www.ic.gc.ca>, accessed on 22 September 2023), the United States (USPTO, <https://www.uspto.gov/>, accessed on 22 September 2023), Australia (AUSPAT, <https://pericles.ipaustralia.gov.au/>, accessed on 21 February 2024), LATIPAT (Latin America, <https://lp.espacenet.com/>, accessed on 21 February 2024), and China (CPO, accessed on 21 February 2024) have been used. The search was limited to articles published within the last ten years (2013–2023) using the keywords “Trichomoniasis” OR “*Trichomonas vaginalis*” AND “Diagnosis”. The inclusion criteria were: (1) articles that aimed to compare or to evaluate the performance of methods in diagnosing trichomoniasis; (2) articles that used methodologies applicable to routine clinical laboratory practice; (3) articles that discussed diagnostic techniques for *Trichomonas vaginalis* and other associated STIs. The exclusion criteria were languages other than English, Portuguese, and Spanish, and year of publication before 2013.

## 2. Consolidated Methods for Trichomoniasis Diagnosis

### 2.1. Wet Mount

The accuracy of diagnosing *T. vaginalis* has notably improved over the past decade, with the availability of a broader range of tests. Wet mount is a traditional and common method for diagnosing trichomoniasis. The method is low-cost, low-tech, and easy to prepare, but it has low sensitivity, especially in men. The wet mount examination involves collecting material through a swab and visualizing the parasite in secretions (vaginal, endocervical, urethral, urine sediment) using a conventional microscope. This is based on trophozoite morphological characteristics such as pear shape, the presence of flagella, an undulating membrane, and asynchronous motility.

The main limitation of this technique is its immediate execution requirements, which cannot exceed a few hours since the organisms lose motility *ex vivo* due to temperature differences. Therefore, the slides must be prepared and analyzed as soon as possible after clinical sample collection to avoid false-negative results. In fact, the microscopic examination should be conducted within 10 min after collection for the most accurate results [23]. To achieve a successful diagnosis using a wet mount, it is also crucial to have a qualified professional present who can identify the parasite, even under abnormal conditions regarding morphology and motility. Furthermore, the parasite load required to make an accurate diagnosis is not yet standardized [24]. Such limitations compromise the sensitivity of the technique, which is generally lower than that of other methods. Sensitivities range from 50 to 70%, depending on the reader’s experience [23]. A cross-sectional study evaluated the diagnostic precision of the wet mount and PCR methods

against culturing and considered reference standard for directly diagnosing *T. vaginalis* among symptomatic women. The swabs were tested for *T. vaginalis* with wet mount microscopy (WMM) in-house PCR and *T. vaginalis* culturing. The sensitivity and agreement kappa of the WMM were observed to be lower compared to PCR. However, the specificity for both methods was high, with 100% (95% confidence interval 97–100) for WMM and 99.3% (95% confidence interval 96–100) for PCR, respectively. Among the *T. vaginalis*-positive women, a decrease was observed in the sensitivity of the WMM, compromising treatment of two-thirds of the patients. The authors recommend further research to integrate PCR tools into diagnostic algorithms for trichomoniasis [25].

## 2.2. Staining Techniques

Staining techniques can be combined with wet mount examination to enhance the diagnosis of trichomoniasis. Among the most commonly used staining technique in clinical laboratories for the identification of *T. vaginalis* trophozoites is the Papanicolaou smear, which can be easily applied to urine sediment samples. Urine sediment is a clinical sample that is readily available and abundant. It is a relatively rapid technique (staining time of application, fixing, drying, and reading) and is reasonably cost-effective for implementation in laboratory routines. A meta-analysis conducted on research published between 1976 and 1998 concerning the efficacy of Papanicolaou staining in detecting vaginal trichomoniasis revealed a cytological evaluation specificity of 97%. Other staining and fixation methods have also been described in the literature, such as Giemsa and Gram staining. However, it has been demonstrated that Giemsa staining does not allow for the identification of the characteristic structures of the parasite, while Gram staining does not provide satisfactory fixation performance and the identification of morphological features [16]. Indeed, staining methods are not recommended in the clinical laboratory routine due to the potential for false negatives and false positives [7]. A presumptive diagnosis of *T. vaginalis* in a Papanicolaou staining smear can be identified by a perinuclear halo in epithelial cells. It is worth noting that even with well-trained professionals present for identification, the absence of the parasite does not necessarily exclude the possibility of the patient being infected [26]. While

*T. vaginalis* may incidentally appear in a Pap test, it is essential to understand that neither conventional nor liquid-based Pap smears serve as diagnostic tests for trichomoniasis. According to the Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines from CDC, women who test positive for *T. vaginalis* on a Pap smear should undergo retesting using sensitive diagnostic methods, and treatment should be administered if the infection is confirmed [27].

## 2.3. Culture Exam

The culture examination for *T. vaginalis* demonstrates superior sensitivity compared to the wet mount test. Samples from women (vaginal, cervical, endocervical secretions or urine sediment) or men (urethral secretion or urine sediment) must be immediately inoculated into the culture medium after collection. Cultures are maintained at 37 °C and meticulously observed under a microscope daily for up to 5 days until motile trophozoites are detected [28]. Typically, cultures from women with trichomoniasis yield positive results within the initial 3 days following inoculation. Nonetheless, male cultures require daily examination for a period of 5 days or longer before being deemed negative. Extended incubation times are frequently necessary to facilitate the growth of a discernible quantity of organisms from male specimens [28]. In contrast to the sensitivity of Nucleic Acid Amplification Techniques, the sensitivity of culture examination varies from 44% to 75% for detecting *T. vaginalis* in female samples. For men, culture sensitivity ranges from 40% to 56% for detecting this pathogen. Notably, urine from men demonstrates higher sensitivity for culture compared to a urethral specimen. Liquid culture media are relatively affordable; however, their cost is augmented by the necessity of extended incubation time and daily scrutiny by a skilled microscopist, leading to results taking up to a week [29]. Historically, culture techniques such as the InPouch system (BioMed Diagnostics, White Vite, OR, USA)

were deemed the gold standard for diagnosing *T. vaginalis* infection prior to the advent of NAAT [7].

#### 2.4. Point-of-Care Tests

Rapid or point-of-care (POC) tests for the detection of *T. vaginalis* have also gained prevalence in clinical practice. The OSOM Trichomonas Rapid Test is based on the detection of antigens from *T. vaginalis*. This immunochromatographic capillary-flow enzyme immunoassay employs membrane proteins that can detect the parasite in up to 10 min. Although it features an increase in the cost related to the material, a reduction is observed in monthly labor costs and the time devoted to microscopy. Moreover, the test can be performed as part of high-volume laboratory analysis, and shows specificity in cases of infection with low trichomonads charge loads [30]. Compared with the wet mount method, the OSOM test has a better result, with sensitivities ranging from 83 to 90%. Furthermore, it does not require special instruments for its analysis, and therefore its use is quite common in gynecological clinics, emergency rooms, and in self-test programs [31]. In 2008, an observational study conducted at the University of Pittsburgh, identified by [Clicantrials.gov](#) ID NCT00682851, evaluated, validated the accuracy of two rapid tests (OSM Trichomonas and OSOM BVBlue test) for diagnosing trichomoniasis and bacterial vaginosis, respectively. The sensitivity for symptomatic women was 92% (confidence interval: 78 to 98), while for asymptomatic women, it was 91% (confidence interval: 71 to 99). Regarding specificity, it was 99% (confidence interval: 97 to 100) for both symptomatic and asymptomatic women [32].

Point-of-care tests can also be based on acid nucleic detection. Affirm™ VP III (Becton Dickinson, MD, USA) is an unamplified acid nucleic probe used as a POC test to detect *T. vaginalis*, *Gardnerella vaginalis* and *Candida albicans*. The Affirm VP III is approved by the FDA and uses specific oligonucleotide probes to detect nucleic acid of *T. vaginalis*. The processing and test samples require a heating unit and a processor [28]. The performance results of this assay are better than those of wet mount and culture examination, and present excellent specificity to *T. vaginalis*, but are significantly less sensitive than NAAT [33]. The Solana Trichomonas assay (Quidel) is an additional rapid test designed for the qualitative detection of *T. vaginalis* DNA, which can deliver results in under 40 min following specimen collection. This assay is FDA-approved for diagnosing *T. vaginalis* from both female vaginal and urine specimens, and is applicable to asymptomatic and symptomatic women. It boasts a sensitivity exceeding 98% when compared to NAAT for vaginal specimens and over 92% for urine specimens. The Amplivue Trichomonas assay (Quidel) is another rapid test allowing the qualitative detection of *T. vaginalis*. It has been FDA-cleared for vaginal specimens from both symptomatic and asymptomatic women, boasting a sensitivity of 90.7% and a specificity of 98.9% when compared to NAAT. It is important to note that neither the OSOM assay nor the Affirm VP III test have FDA clearance for use with specimens from men [34].

#### 2.5. Molecular Based Methods

Due to the precision of molecular biology tests, these techniques have revolutionized laboratory diagnostics by elucidating the genes of microorganisms as well as the products they encode. Technologies based on nucleic acid amplification are surprising as regards their high performance in STI diagnosis, thus reducing analysis time and enabling the detection of infections in non-invasive ways. In this sense, the search for new diagnostic alternatives has been undertaken using innovative molecular techniques or new detection targets. In this scenario, a study employed a multiplex PCR assay to assess its capacity for concurrently detecting *T. vaginalis*, *N. gonorrhoeae* and *C. trachomatis* using urine, liquid cytology, and swabs from vaginal and rectal sites. Its results can be obtained within 2 h, showcasing a low detection limit even when other targets are present, consistent with findings from previously tested patient samples. This versatile multiplex STI assay offers a rapid and cost-effective approach to molecular diagnostics, catering to diverse laboratory

settings. These attributes collectively render it exceptionally well-suited for deployment in clinical laboratories [35]. The Max CTGCTV2 assay (Becton Dickinson, New Jersey, NJ, United States) represents an advanced iteration of molecular triplex techniques for identifying *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, and *Trichomonas vaginalis*. It is FDA- approved for use in detecting *T. vaginalis* in both vaginal swab and urine specimens, offering sensitivity and specificity of 86.6% to 97.9% and 99.2% to 99.8%, respectively, depending on the type of specimen, be it vaginal swab (97.8% and 99.6%), endocervical swab (89.9% and 99.8%), and male urine (97.9%) [36]. A comparative study of the diagnostic performance of the BD MAX vaginal panel (Becton, Dickinson and Company, BD Life Sciences—Diagnostic Systems, New Jersey, NJ, United States) molecular test versus the clinician assessment of vaginitis was performed, using Amsel’s criteria for bacterial vaginitis, the presence of pseudohyphae or budding yeast for candidiasis, and wet mount microscopy for *T. vaginalis*. The authors illustrated a notably elevated sensitivity and negative predictive value of molecular testing compared to clinician-administered tests. This enhancement aids in the precise identification of vaginitis [37]. The Allplex™ STI Essential assay (Seegene®, Seoul, Republic of Korea) utilizes a multiplex Real-Time PCR (RT-PCR) technique as its foundation [38]. This in vitro diagnostic (IVD) system, bearing European Conformity (EC) marking, was engineered for the concurrent identification of seven pathogens—*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, and *T. vaginalis*—using genital swabs, urine, and cytology liquid. In a comparative study conducted by Salazar et al. in 2019, Aptima® assays (Hologic®, San Diego, United States) demonstrated greater sensitivity across various sample types compared to the Allplex™ STI Essential assay (Seegene®) [39].

Techniques currently recognized as the reference for detecting *T. vaginalis* include those that amplify and detect the parasite’s nucleic acids (DNA or RNA). The first FDA- approved NAAT was the APTIMA® (Hologic, Inc., San Diego, United States) *Trichomonas vaginalis* Assay, which was introduced in 2011 and has been utilized ever since [39,40]. This technique shows sensitivity ranging from 95.2% in urine samples to 100% in vaginal and cervical secretion samples. The parasite is identified in urine sediment and samples collected for oncolytic cytology. This technology relies on extracting rRNA from the specimens being analyzed, followed by the transcription-mediated amplification of the captured rRNA. Utilizing this target naturally enhances the detection limit, given that each organism contains over 100 copies of rRNA. These amplified products are detected by a chemiluminescent reaction [41]. Recently, the performances of Hologic Aptima BV and CV/TV assays were compared to those of other methods of vaginitis diagnosis using more than 600 samples from a local health system. The authors described 100% of positive and negative agreement for *T. vaginalis* detection between Aptima CV/TV and Aptima TV technologies [42]. The Xpert® TV Assay (Cepheid, Sunnyvale, CA, United States) technology applies the real-time PCR technique through disposable cartridges for the qualitative detection of *T. vaginalis* and several STIs, such as chlamydia and gonorrhea, with positive results in approximately 40 min of analysis at the POC. First-catch urine, endocervical, and vaginal swab samples can be analyzed. Moreover, the specificity and sensitivity were found to be high and comparable when using both female and male samples [17,43]. The Probe Tec TV Qx Amplified DNA Assay (Becton Dickinson) is FDA- cleared for detecting *T. vaginalis* from vaginal (patient-collected or clinician-collected) swabs, endocervical swabs, or urine specimens from women. It boasts a sensitivity of 98.3% and a specificity of 99.6%, compared to wet mount and culture methods [22]. Like the Aptima *T. vaginalis* assay, this test is exclusively FDA-cleared for female use and requires internal validation before application in male specimens.

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a molecular biology technique used for the rapid and specific amplification of DNA under isothermal conditions. The widespread applications in several fields, including clinical diagnostics, environmental monitoring, and research, relate to its high sensitivity and specificity; reactions typically produce results within 30 min to a few hours, and it also shows versatility [44]. A novel

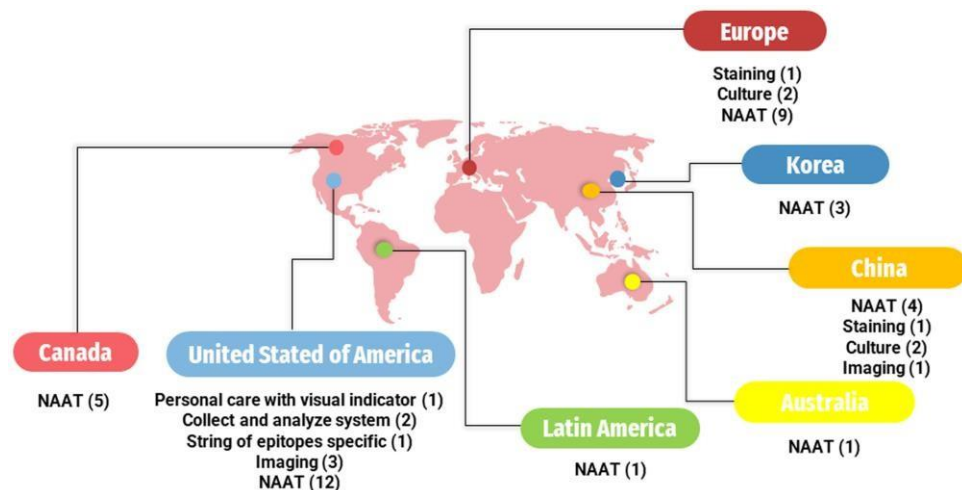
detection approach for *T. vaginalis* has been developed utilizing loop-mediated isothermal amplification targeting the adhesion protein 65 (AP65) gene. This rapid detection method was fine-tuned to optimize the reaction system and the conditions for ideal performance. Analyses of sensitivity indicated that the LAMP assay, focusing on the AP65 gene, displayed a sensitivity level surpassing that of the commonly employed nested PCR, which targets the actin gene for detecting *T. vaginalis*, by a factor of 1000. The LAMP assay was found to have a minimum detection limit as low as 10 trichomonads. Furthermore, the amplification of the target gene AP65 via the LAMP assay exhibited outstanding specificity, yielding products solely from *T. vaginalis*. Importantly, this LAMP detection technique did not exhibit any cross-reactivity with common pathogens, such as *Candida albicans*. Based on the findings of this study, the LAMP assay directed at the AP65 gene emerges as an effective approach for the early detection of *T. vaginalis* infections. Consequently, the researchers propose the LAMP assay as a valuable point-of-care diagnostic tool, although it is not commercially available yet, and it offers an alternative molecular approach with significant potential for enhancing the treatment, control, and prevention of trichomoniasis transmission and related complications [45]. Considering the global health concern of cervical cancer, primarily driven by high-risk human papillomavirus (HPV) infections and the connections with trichomoniasis, researchers have introduced a novel approach using a microfluidic-chip-based system paired with loop-mediated isothermal amplification (LAMP), enabling the swift and simultaneous identification of *T. vaginalis*, as well as specific HPV types (HPV16, HPV18, and HPV52). The system offers enhanced sensitivity, cost-effectiveness, and facility of use, making it particularly applicable in resource-constrained settings. Additionally, its capacity to detect multiple pathogens' positions makes it a versatile tool with potential applications beyond cervical cancer diagnostics.

### 3. Clinical Trials

Clinical Trials is a USA website and online database that provides information about current clinical studies around the world. Among these, five completed studies have specifically focused on diagnostic techniques. The first multi-center study was an interventional type study entitled "Clinical study of a Single-Use, Point-of-Care Molecular Diagnostic Device for the Detection of *N. gonorrhoeae*, *T. vaginalis*, and *C. trachomatis* utilizing vaginal swabs" (NCT03596151). The hypothesis of this study was that the Click Diagnostics Sexual Health Test performs comparably to the NAAT predicate system, and the identification of each organism in self-collected vaginal swabs by women using the Click device will show high sensitivity and specificity, aligning with the Patient Infected Status (PIS). The primary aim of this study was to evaluate the effectiveness of the Click device in detecting *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, and *T. vaginalis* in self-collected vaginal specimens as compared to PIS. The sensitivity of the Click device was 96.7%, while the specificity was 94.2% [46]. Another observational study (NCT02566447) was conducted to establish the clinical performance of the Solana<sup>®</sup> Trichomonas Assay for the detection of *T. vaginalis* in both vaginal swabs and urine samples. This assay is an NAAT that utilizes helicase-dependent amplification (HDA) for the diagnosis of trichomoniasis. The results of this study were not available on the website [47]. Another observational study used the APTIMA<sup>®</sup> assay (NCT01728103), which qualitatively detects the ribosomal RNA from *C. trachomatis* and/or *N. gonorrhoeae* and *T. vaginalis* in female specimens [48]. NCT02203942 was a study that validated NAAT testing by comparing it with conventional methods for the diagnosis of vaginitis, including the Amsel criteria, Nugent score, yeast culture, and trichomonad culture. However, at this moment there are no results available on the website [49]. Another study (NCT02641717) validated patient-collected wet mounts by comparing them with clinician-collected specimens from symptomatic women. Currently, there is limited literature on this topic. Therefore, self-collection can enhance the performance and efficiency of diagnosing vaginitis [50].

#### 4. Patents

The patent databases from the following countries and continents were consulted: Brazil (INPI, n = 1), Canada (CIPO, n = 5), Korea (KIPO, n = 3), United States (USPTO, n = 19), Europe (Espacenet, n = 12), Australia (AUSPAT, n = 1), Latin America (LATIPAT, n = 1), and China (CPO, n = 8) (Figure 1). The identified techniques included staining, culturing, NAATs, and novel approaches (Table 2).



**Figure 1.** Worldwide distribution of registered patents by country. ( ): Number inside parentheses indicates the number of patents on the respective methodology. NAAT: Nucleic Acid Amplification Tests.

##### 4.1. Staining Technique

Only one patent was found that describes the staining technique for diagnosing atypical trichomoniasis when an infection occurs in the bloodstream, which is very rare. In summary, these procedures are divided into the collection of peripheral blood from the patient, sample preparation, the enzymatic destruction of blood elements, a smear on a slide, staining with 1% aqueous methylene blue solution, and finally, analysis under a microscope. This method is an efficient technique for diagnosis and has high sensitivity [51].

##### 4.2. Culture Exam

Before the advent of NAATs, the isolation of the protozoa in specific culture media was the gold standard for the diagnosis of trichomoniasis. Regarding this approach, a technique has been developed that combines cultural examination—to detect the presence of *T. vaginalis*—with the preparation of smears and Giemsa staining—to assess the patient's leukocytosis. The culturing of the urogenital tract sample is performed in a selective medium and incubated at 37 °C for three days. Subsequently, the stained smears are analyzed using methylene blue and the Feulgen method [52]. Another patent that has been developed describes a new liquid medium for the isolation of the parasite. Some of the components of the medium include thioglycolate, glycine, human blood plasma, and glucose, which promote the growth of *T. vaginalis* [53].

##### 4.3. Nucleic Acid Amplification Techniques—NAATs

NAATs are the diagnostic approach with the most patents in all consulted databases. One invention presents nucleic acid-based tests for detecting vaginitis and/or vaginosis-causing pathogens in samples from symptomatic patients. Samples can be collected from various areas including the urethra, penis, anus, throat, cervix, or vagina. The tests can identify several pathogens including *Trichomonas vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus* spp., and *Candida* spp. [54–56]. Furthermore, *T. vaginalis* can be detected along with *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, and *Mycoplasma* spp. through an assay based on the amplification of oligonucleotide primers and probes [57,58].



Another invention that specifically detects *T. vaginalis* by multiplex PCR in a single test tube and discriminates *T. tenax* and *Pentatrichomonas hominis* was also patented [59,60].

One nested polymerase chain reaction (PCR) method can detect *T. vaginalis* in urine. It uses a specific gene sequence, AP51-3, to design a primer. The method involves amplification and electrophoretic steps. It is straightforward to use, highly sensitive, and specific [61]. This patent that presents the primer composition of F3, B3, FIP, and BIP primers, and can be utilized for LAMP amplification in *T. vaginalis* detection; it also exhibits high sensitivity and specificity [62]. Another method for diagnosing trichomoniasis involves the detection of the TV 40S ribosomal protein gene through PCR, which is carried out in mostly substantially automated manner. The sample can be taken from an endocervical, vaginal, or urethral swab [63,64]. A diagnostic kit for diagnosing vaginitis at low costs was developed in the Republic of Korea. The device is divided into a sample introducing unit, a nucleic acid extraction unit, and a PCR unit [65].

Oligonucleotides are short nucleic acid sequences that can be used to determine the presence of *T. vaginalis* in a biological sample, as described in a patent. The determination occurs through the multi-phase amplification of a target nucleic acid sequence [66,67]. Another patent provides oligonucleotides and methods for the simultaneous detection of *T. vaginalis* and *Mycoplasma genitalium* through the multiplex detection of nucleic acids using mixed reporters [68].

Different methods allow the simultaneous detection of pathogens causing sexually transmitted infections. A system for generating diagnostics based on detecting microbiome targets has been patented. It includes a sampling kit, diagnostic analyses to generate a microbiome sequence dataset from microorganism nucleic acid sequences, and therapy recommendations [69]. In addition, next-generation sequencing (NGS) can analyze IST pathogens and human papillomavirus (HPV) in any sample [70]. Another method uses loop-mediated isothermal amplification (LAMP), whereby released nucleic acids are amplified by LAMP using specific primers targeting these pathogens' nucleic acids [71].

#### 4.4. Biomarker Tests

Peptidases are important enzymes in *T. vaginalis*, aiding in protein breakdown. Peptidases are divided into types such as cysteine (CP), metallo (MP), serine (SP), threonine (TP) and aspartic (AP) [72]. Methods for the production of antibodies against metallopeptidase (TvMP50) and TvMP50 recombinant contribute in diagnosing trichomoniasis in men [73,74]. TvCP39, another peptidase, is used for *T. vaginalis* detection [75]. An inhibitor of TvCP39 can serve as a diagnostic marker for this infection, such as trichocystatin 2 protein, a cysteine proteinase inhibitor [76]. Another useful cysteine proteinase for *T. vaginalis* diagnosis is TvCP4 [77]. TvCP2 levels, useful for immunodiagnosics and as markers of trichomoniasis, can also be detected [78]. Pyruvate-ferredoxin oxidoreductase (PFOR) is a key enzyme in flagellated protozoa, aiding pyruvate oxidation and acetyl-coA production [79]. A patent as introduced an immunological method for detecting *T. vaginalis* in bodily secretions and urine, identifying PFOR and adhesion proteins as markers [80]. Another patent utilizes polymerase chain reactions for the amplification and detection of the *T. vaginalis* AP65-1 gene by exposing a biological sample to an oligonucleotide probe [81].

#### 4.5. Novel Approaches

##### 4.5.1. Devices of Images

In the USA's database, new methods for diagnosing trichomoniasis can be found. The first invention is a urine specimen analyzer, which obtains information about the counts of *T. vaginalis* trophozoites, squamous epithelium cells, and white blood cells. This equipment consists of a detector that identifies urine particles and an analysis unit responsible for counting [82]. Another invention is an imaging platform for the detection of motile objects in a fluid sample. In this context, *T. vaginalis* is a flagellated protozoan; therefore, it can be detected through a computing device that receives images from the sensors and light sources used to analyze the sample [83]. Furthermore, another patent describes a device

with a microfluidic module associated with an image sensor and a processor. This device can be utilized for motion-based pathogen detection [84].

#### 4.5.2. Other Devices

One characteristic of vaginitis is the high concentration of amines at the infection site. For this reason, a personal care product with an amine-sensitive dye was created to visually identify this infection. This invention can be useful in the diagnosis of vaginitis if the indicator is placed in products used for feminine hygiene [85]. Another invention offers a method for detecting and diagnosing STIs using a specific string of epitopes (SOE). In the case of diagnosing trichomoniasis, the SOE can detect the following proteins in vaginal fluid, semen, or prostatic fluid: aldolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH),  $\alpha$ -enolase, and actinin [86].

**Table 2.** Patents found in the databases INPI (Brazil), CIPO (Canada), UPSTO (USA), KIPO (Republic of Korea), ESPACENET (Europe), LATIPAT (Latin America), AUSPAT (Australia), and CPO (China). Databases accessed in September 2023.

Database	Detects	Sample/Technique	Region of Deposit	Date of Deposit (Date Month Year)	Inventors	Publication Number
INPI CIPO UPSTO LATIPAT AUSPAT CPO	<i>Candida albicans</i> <i>Trichomonas vaginalis</i> Bacterial vaginosis	Urogenital secretion, urine/Multiplex nucleic acid-based detection in a sample	BR CA USA LA AU CN	20.04.2016 15.01.2016 11.10.2018 27.04.2023 20.04.2016 08.07.2021	[54–56]	BR1120170223791A2 CA2982467 US20180291431A1 ES2939810 AU2016252551 US20217370923A
ESPACENET CPO	<i>T. vaginalis</i>	Blood/Staining	EU CN	21.12.2017	[51]	RU2639452C1 RU2017109830A
ESPACENET CPO	<i>T. vaginalis</i>	Urogenital secretion/Culture and staining	EU CN	10.06.2015	[52]	RU2552320C1
ESPACENET CPO	<i>T. vaginalis</i>	New medium culture	EU CN	21.04.2015	[53]	UA103506U UAU201503787U
ESPACENET CPO	<i>T. vaginalis</i>	Samples of men/Polyclonal antibodies, TvMP50 *	EU CN	13.05.2013	[73,74]	MX2012000112W WO2013070056A1
ESPACENET	<i>T. vaginalis</i>	Biological sample/LAMP amplification	EU	09.08.2017	[62]	CN107142327A
ESPACENET	<i>T. vaginalis</i>	Urine/Nested PCR	EU	30.04.2014	[61]	CN103757108A
ESPACENET	<i>T. vaginalis</i>	Biological samples/Diagnosis tests based on nucleotide sequences (TvCP39)	EU	29.01.2013	[75]	MX2011007531A
ESPACENET	<i>T. vaginalis</i>	Trichocystatin 2 protein *	EU	29.02.2016	[76]	MX2014010400A
ESPACENET	<i>T. vaginalis</i>	TvCP4 *	EU	01.12.2014	[77]	MX2013006126A
ESPACENET CPO	<i>T. vaginalis</i>	PFOR *	EU CN	26.04.2013 27.10.2011	[80]	MX2011011361A

Table 2. Cont.

Database	Detects	Sample/Technique	Region of Deposit	Date of Deposit (Date Month Year)	Inventors	Publication Number
CIPO USPTO	<i>T. vaginalis</i>	Endocervical, vaginal, and urethral swab sample/PCR Presence or absence of the TV 40S ribosomal protein (Tv40Srp) gene or RNA in the sample	CA USA	19.12.2016 29.06.2017	[63,64]	CA2953006 US20170183746A1
CIPO USPTO	<i>T. vaginalis</i>	Biological or non-biological sample/Multiplex detection by PCR	CA USA	30.11.2017 30.11.2017	[59,60]	CA3025585 US20170342508A1
CIPO USPTO	<i>T. vaginalis</i>	Biological sample/An amplification oligonucleotide for use in amplifying a target nucleic acid sequence	CA USA	07.01.2021 29.09.2022	[66,67]	CA3144452 US20220307093A1
CIPO USPTO	<i>T. vaginalis</i> <i>Chlamydia trachomatis</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Mycoplasma</i>	Biological sample/ Combinations of forward oligonucleotide primers, reverse oligonucleotide primers, and oligonucleotide probes	CA USA	31.12.2018	[57,58]	CA3088866 US20190211379A1
KIPRIS	Agents causing vaginitis	Biological sample/Device with a PCR unit	ROK	02.09.2017	[65]	1020150102826
USPTO CPO	<i>T. vaginalis</i>	Urine/Urine specimen analyzer with a detector and an analysis unit	USA CN	24.08.2023 30.08.2023	[82]	US20230266298A1 JP2022024062A
USPTO	<i>T. vaginalis</i> <i>M. genitalium</i>	Biological samples/Multiplex detection of nucleic acids using mixed reporters	USA	13.07.2023	[68]	US20230220463A1
USPTO	Visual indication of infection in vaginitis	A personal care product with an indicator strip that contains an amine-sensitive dye	USA	27.03.2014	[85]	US20140087417A1
USPTO	STIs	Biological sample/Method that generates a diagnosis based on the detected set of microbiome targets	USA	30.06.2016	[69]	US20170002432A1
USPTO	<i>T. vaginalis</i> <i>Treponema</i> spp. <i>Neisseria</i> spp.	Vaginal fluid or washing, or semen or prostatic fluid/Uses an SOE specific for highly immunogenic regions of proteins from pathogens	USA	23.05.2019	[86]	US20190154689A1
USPTO	STIs HPV	Any sample/NGS	USA	10.12.2020	[70]	US20200385821A1

Table 2. Cont.

Database	Detects	Sample/Technique	Region of Deposit	Date of Deposit (Date Month Year)	Inventors	Publication Number
USPTO	Motile objects	Fluid sample/Imaging platform	USA	02.12.2021	[83]	US20210374381A1
USPTO	Motile pathogen	Fluid sample/Microfluidic imager	USA	23.12.2021	[84]	US20210398296A1
USPTO AUSPAT	STIs <i>T. vaginalis</i>	Urine/LAMP	USA	25.05.2023	[71]	US20230160021A1
CPO		Biological sample/PCR AP65-1 gene *	AU CN	29.06.2016 21.12.2011	[81]	ES2575538 EP10701589A

INPI—Instituto Nacional da Propriedade Industrial (Brazil); CIPO—Canadian Patents Database; KIPRIS—Korea Intellectual Property Rights Information Service; USPTO—United States Patent and Trademark Office; STIs—sexually transmitted infections; LAMP—loop-mediated isothermal amplification; PCR—Polymerase Chain Reaction; SOE—string of epitopes; HPV—human papillomavirus; NGS—next-generation sequencing; BR—Brazil; CA—Canada; USA—United States of America; LA—Latin America; AU—Australia; EU—Europe; CN—China; ROK—Republic of Korea. \* Biological marker.

## 5. Conclusions

Trichomoniasis caused by *Trichomonas vaginalis* is a highly prevalent STI associated with an increased risk of the acquisition and transmission of HIV, as well as premature birth, pelvic inflammatory disease, cervical and prostate cancers, and infertility. Recent advances in the diagnosis of this underdiagnosed infection, especially using molecular methods, are of paramount importance for the epidemiological control of this pathology and its comorbidities, especially in asymptomatic cases. As the application of more sensitive diagnostic techniques based on nucleic acid detection tests has been seen, more cases of *T. vaginalis* infection will be detected, and more infections that appeared clinically cured may be identified as present in an asymptomatic form. Among symptomatic women, wet mount microscopy is recommended, with special attention paid to ensure immediate execution in a few hours so as to avoid the loss of the organism's motility *ex vivo*, followed by death. The inclusion of trichomoniasis in screening tests is an important step as a strategy for the reduction and control of this and related ISTs, along with cost reduction, through drug treatments. In this review, our search for clinical trials related to trichomoniasis diagnosis granted us access to both ongoing and completed studies evaluating the accuracy, sensitivity, and specificity of diagnostic tests. Additionally, we identified 40 patents related to trichomoniasis diagnosis within the last 10 years, indicating a significant presence in the STI diagnostics scenario. This suggests a competitive landscape among numerous companies and institutions striving to offer novel inventions with potential industrial applications soon. Our assessment underscores the importance of researchers meticulously considering the entire translational process concerning infection management. This process encompasses the entire evolution from laboratory investigations to the refinement of clinical testing methodologies, alongside the innovation of novel patents and solutions aimed at addressing prevailing challenges. Considering that the clinical tests demonstrate similarities to other approved methods, our article emphasizes the necessity of continued studies concerning diagnostic targets in *T. vaginalis*, as well as the pursuit of innovative approaches.

**Author Contributions:** F.G.C., G.V.R. and T.T. conceptualized the idea of the review; F.G.C., M.D.F. and G.V.R. searched the literature and wrote the manuscript draft; F.G.C. and M.D.F. organized the tables; G.V.R. and T.T. revised the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
**Funding:** This study was supported by the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento (CAPES)—Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). T.T. thanks CNPq for the researcher fellowship (grant 09764/2021-1).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

- Rowley, J.; Vander Hoorn, S.; Korenromp, E.; Low, N.; Unemo, M.; Abu-Raddad, L.J.; Chico, R.M.; Smolak, A.; Newman, L.; Gottlieb, S.; et al. Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: Global prevalence and incidence estimates, 2016. *Bull. World Health Organ.* **2019**, *97*, 548-562. [[CrossRef](#)]
- Eleutério, J., Jr.; Campaner, A.B.; de Carvalho, N.S. Diagnosis and treatment of infectious vaginitis: Proposal for a new algorithm. *Front. Med.* **2023**, *10*, 1040072. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Yang, H.Y.; Su, R.Y.; Chung, C.H.; Huang, K.Y.; Lin, H.A.; Wang, J.Y.; Chen, C.-C.; Chien, W.-C.; Lin, H.-C. Association between trichomoniasis and prostate and bladder diseases: A population-based case-control study. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 15358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Menezes, C.B.; Frasson, A.P.; Tasca, T. Trichomoniasis—Are we giving the deserved attention to the most common non-viral sexually transmitted disease worldwide? *Microb. Cell* **2016**, *3*, 404-419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Masha, S.C.; Cools, P.; Sanders, E.J.; Vaneechoutte, M.; Crucitti, T. *Trichomonas vaginalis* and HIV infection acquisition: A systematic review and meta-analysis. *Sex. Transm. Infect.* **2019**, *95*, 36-42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mavedzenge, S.N.; Pol, B.V.; Cheng, H.; Montgomery, E.T.; Blanchard, K.; de Bruyn, G.; Ramjee, G.; Straten, A. Epidemiological synergy of *Trichomonas vaginalis* and HIV in Zimbabwean and South African women. *Sex. Transm. Dis.* **2010**, *37*, 460-466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Workowski, K.A.; Bachmann, L.H.; Chan, P.A.; Johnston, C.M.; Muzny, C.A.; Park, I.; Reno, H.; Zenilman, J.M.; Bolan, G.A. Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines, 2021. *MMWR Recomm. Rep.* **2021**, *70*, 1-187. [[PubMed](#)]
- Ghosh, A.P.; Aycocock, C.; Schwebke, J.R. In Vitro Study of the Susceptibility of Clinical Isolates of *Trichomonas vaginalis* to Metronidazole and Secnidazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e02329-17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Alessio, C.; Nyirjesy, P. Management of Resistant Trichomoniasis. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **2019**, *21*, 31. [[CrossRef](#)]
- Mtshali, A.; Ngcapu, S.; Govender, K.; Sturm, A.W.; Moodley, P.; Joubert, B.C. In Vitro Effect of 5-Nitroimidazole Drugs against *Trichomonas vaginalis* Clinical Isolates. *Microbiol. Spectr.* **2022**, *10*, e0091222. [[CrossRef](#)]
- Secor, W.E.; Meites, E.; Starr, M.C.; Workowski, K.A. Neglected parasitic infections in the United States: Trichomoniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2014**, *90*, 800-804. [[CrossRef](#)]
- Kumar, S.; Chesson, H.; Gift, T.L. Estimating the Direct Medical Outpatient Costs of Diagnosis and Treatment of Trichomoniasis Among Commercially Insured Patients in the United States, 2016 to 2018. *Sex. Transm. Dis.* **2021**, *48*, e45-e47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Chesson, H.W.; Blandford, J.M.; Pinkerton, S.D. Estimates of the annual number and cost of new HIV infections among women attributable to trichomoniasis in the United States. *Sex. Transm. Dis.* **2004**, *31*, 547-551. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Nathan, B.; Appiah, J.; Saunders, P.; Heron, D.; Nichols, T.; Brum, R.; Alexander, S.; Baraitser, P.; Ison, C. Microscopy outperformed in a comparison of five methods for detecting *Trichomonas vaginalis* in symptomatic women. *Int. J. STD AIDS* **2015**, *26*, 251-256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Diamond, L.S. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *J. Parasitol.* **1957**, *43*, 488-490. [[CrossRef](#)]
- Menezes, C.B.; Mello, M.D.S.; Tasca, T. Comparison of permanent staining methods for the laboratory diagnosis of trichomoniasis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **2016**, *58*, 5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Huppert, J.S.; Mortensen, J.E.; Reed, J.L.; Kahn, J.A.; Rich, K.D.; Miller, W.C.; Hobbs, M.M. Rapid antigen testing compares favorably with transcription-mediated amplification assay for the detection of *Trichomonas vaginalis* in young women. *Clin. Infect. Dis.* **2007**, *45*, 194-198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gaydos, C.A.; Klausner, J.D.; Pai, N.P.; Kelly, H.; Coltart, C.; Peeling, R.W. Rapid and point-of-care tests for the diagnosis of *Trichomonas vaginalis* in women and men. *Sex. Transm. Infect.* **2017**, *93*, S31-S35. [[CrossRef](#)]

19. Butler, S.E.; Augostini, P.; Secor, W.E. *Mycoplasma hominis* infection of *Trichomonas vaginalis* is not associated with metronidazole-resistant trichomoniasis in clinical isolates from the United States. *Parasitol. Res.* **2010**, *107*, 1023-1027. [CrossRef]
20. Becker, D.L.; dos Santos, O.; Frasson, A.P.; de Vargas Rigo, G.; Macedo, A.J.; Tasca, T. High rates of double-stranded RNA viroses and *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* clinical isolates in South Brazil. *Infect. Genet. Evol.* **2015**, *34*, 181-187. [CrossRef]
21. Nye, M.B.; Schwebke, J.R.; Body, B.A. Comparison of APTIMA *Trichomonas vaginalis* transcription-mediated amplification to wet mount microscopy, culture, and polymerase chain reaction for diagnosis of trichomoniasis in men and women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2009**, *200*, 188.e1-188.e7. [CrossRef]
22. Van Der Pol, B.; Williams, J.A.; Taylor, S.N.; Cammarata, C.L.; Rivers, C.A.; Body, B.A.; Nye, M.; Fuller, D.; Schwebke, J.R.; Barnes, M.; et al. Detection of *Trichomonas vaginalis* DNA by use of self-obtained vaginal swabs with the BD ProbeTec Qx assay on the BD Viper system. *J. Clin. Microbiol.* **2014**, *52*, 885-889. [CrossRef]
23. Kissinger, P. *Trichomonas vaginalis*: A review of epidemiologic, clinical and treatment issues. *BMC Infect. Dis.* **2015**, *15*, 307. [CrossRef]
24. Van Der Pol, B. Clinical and Laboratory Testing for *Trichomonas vaginalis* Infection. *J. Clin. Microbiol.* **2016**, *54*, 7-12. [CrossRef]
25. Nabweyambo, S.; Kakaire, O.; Sowinski, S.; Okeng, A.; Ojiambo, H.; Kimeze, J.; Najjingo, I.; Bwanga, F. Very low sensitivity of wet mount microscopy compared to PCR against culture in the diagnosis of vaginal trichomoniasis in Uganda: A cross sectional study. *BMC Res. Notes* **2017**, *10*, 259. [CrossRef]
26. Ismail, K.A.; Hagag, H.M.; Alam-Eldin, Y.H.; Mahmoud, M.K.; Abdulaziz, A.M.; Khalifa, A.M.; Khalifa, O.M. Perinuclear halo indicate *Trichomonas vaginalis* in Pap smear. *Arch. Biotechnol. Biomed.* **2019**, *3*, 001-005.
27. Centers for Disease Control and Prevention. Available online: <https://www.cdc.gov/std/treatment-guidelines/trichomoniasis.htm> (accessed on 15 September 2023).
28. Hobbs, M.M.; Seña, A.C. Modern diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. *Sex. Transm. Infect.* **2013**, *89*, 434-438. [CrossRef]
29. Patil, M.J.; Nagamoti, J.M.; Metgud, S.C. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* from Vaginal Specimens by Wet Mount Microscopy, In Pouch TV Culture System, and PCR. *J. Glob. Infect. Dis.* **2012**, *4*, 22-25. [CrossRef] [PubMed]
30. Campbell, L.; Woods, V.; Lloyd, T.; Elsayed, S.; Church, D.L. Evaluation of the OSOM *Trichomonas* rapid test versus wet preparation examination for detection of *Trichomonas vaginalis* vaginitis in specimens from women with a low prevalence of infection. *J. Clin. Microbiol.* **2008**, *46*, 3467-3469. [CrossRef] [PubMed]
31. Hegazy, M.M.; El-Tantawy, N.L.; Soliman, M.M.; El-Sadeek, E.S.; El-Nagar, H.S. Performance of rapid immunochromatographic assay in the diagnosis of *Trichomoniasis vaginalis*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2012**, *74*, 49-53. [CrossRef] [PubMed]
32. A Validation Study of Genzyme Diagnostics OSOM *Trichomonas* Rapid Test and BVBlue Test. Available online: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT00682851?cond=NCT00682851Crank=1> (accessed on 22 September 2023).
33. Dessai, F.; Nyirenda, M.; Sebitloane, M.; Abbai, N. Diagnostic evaluation of the BD Affirm VP8 assay as a point-of-care test for the diagnosis of bacterial vaginosis, trichomoniasis and candidiasis. *Int. J. STD AIDS* **2020**, *31*, 303-311. [CrossRef]
34. Adamson, P.C.; Loeffelholz, M.J.; Klausner, J.D. Point-of-Care Testing for Sexually Transmitted Infections: A Review of Recent Developments. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2020**, *144*, 1344-1351. [CrossRef]
35. Abou Tayoun, A.N.; Burchard, P.R.; Caliendo, A.M.; Scherer, A.; Tsongalis, G.J. A multiplex PCR assay for the simultaneous detection of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, and *Trichomonas vaginalis*. *Exp. Mol. Pathol.* **2015**, *98*, 214-218. [CrossRef]
36. Van Der Pol, B.; Torres-Chavolla, E.; Kodsí, S.; Cooper, C.K.; Davis, T.E.; Fife, K.H.; Taylor, S.N.; Augenbraun, M.H.; Gaydos, C.A. Clinical Performance of the BD CTGCTV2 Assay for the BD MAX System for Detection of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, and *Trichomonas vaginalis* Infections. *Sex. Transm. Dis.* **2021**, *48*, 134-140. [CrossRef]
37. Schwebke, J.R.; Gaydos, C.A.; Nyirjesy, P.; Paradis, S.; Kodsí, S.; Cooper, C.K. Diagnostic Performance of a Molecular Test versus Clinician Assessment of Vaginitis. *J. Clin. Microbiol.* **2018**, *56*, e00252-18. [CrossRef]
38. Vieira-Baptista, P.; Silva, A.R.; Costa, M.; Aguiar, T.; Saldanha, C.; Sousa, C. Clinical validation of a new molecular test (Seegene Allplex™ Vaginitis) for the diagnosis of vaginitis: A cross-sectional study. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* **2021**, *128*, 1344-1352. [CrossRef]
39. de Salazar, A.; Espadafor, B.; Fuentes-López, A.; Barrientos-Durán, A.; Salvador, L.; Álvarez, M.; García, F. Comparison between Aptima Assays (Hologic) and the Allplex STI Essential Assay (Seegene) for the diagnosis of Sexually transmitted infections. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0222439. [CrossRef]
40. Chapin, K.; Andrea, S. APTIMA® *Trichomonas vaginalis*, a transcription-mediated amplification assay for detection of *Trichomonas vaginalis* in urogenital specimens. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* **2011**, *11*, 679-688. [CrossRef] [PubMed]
41. Schwebke, J.R.; Hobbs, M.M.; Taylor, S.N.; Sena, A.C.; Catania, M.G.; Weinbaum, B.S.; Gaydos, C.A. Molecular testing for *Trichomonas vaginalis* in women: Results from a prospective US clinical trial. *J. Clin. Microbiol.* **2011**, *49*, 4106-4111. [CrossRef] [PubMed]
42. Caza, M.; Charles, M.; Locher, K.; Hoang, L.; Tucker, M.; Mandy, J.; Jewsbury, H.; Wilmer, A. Evaluation of the Aptima BV and CV/TV assays compared to conventional laboratory based testing methods for the diagnosis of vaginitis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2023**, *106*, 115953. [CrossRef] [PubMed]

43. Schwebke, J.R.; Gaydos, C.A.; Davis, T.; Marrazzo, J.; Furgerson, D.; Taylor, S.N.; Smith, B.; Bachmann, L.H.; Ackerman, R.; Spurrell, T.; et al. Clinical Evaluation of the Cepheid Xpert TV Assay for Detection of *Trichomonas vaginalis* with Prospectively Collected Specimens from Men and Women. *J. Clin. Microbiol.* **2018**, *56*, e01091-17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Notomi, T.; Okayama, H.; Masubuchi, H.; Yonekawa, T.; Watanabe, K.; Amino, N.; Hase, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, E63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Li, Y.; Wang, S.; Li, H.; Song, X.; Zhang, H.; Duan, Y.; Luo, C.; Wang, B.; Ji, S.; Xie, Q.; et al. Development of a convenient detection method for *Trichomonas vaginalis* based on loop-mediated isothermal amplification targeting adhesion protein 65. *BMC Infect. Dis.* **2020**, *20*, 319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Clinical Study of a Single-Use, Point-of-Care Molecular Diagnostic Device for the Detection of *Neisseria gonorrhoeae* (NG), *Trichomonas vaginalis* (TV), and *Chlamydia trachomatis* (CT) Utilizing Vaginal Swabs. Available online: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03596151?cond=NCT03596151Crank=1> (accessed on 22 September 2023).
47. Solana™ *Trichomonas* Assay Field Study. Available online: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02566447?cond=NCT02566447Crank=1> (accessed on 22 September 2023).
48. Prospective Collection of Female Specimens for Testing with Gen-Probe APTIMA (Registered Trademark) Assays. Available online: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT01728103?cond=NCT01728103Crank=1> (accessed on 22 September 2023).
49. Comparing NAAT Testing to Standard Methods for the Diagnosis of Vaginitis (VAST). Available online: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02203942?cond=%20NCT02203942Crank=1> (accessed on 22 September 2023).
50. Validity of Patient-Collected Wet Mounts. Available online: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02641717?cond=NCT02641717Crank=1> (accessed on 22 September 2023).
51. Diagnostic Technique for Urogenital Trichomoniasis. Available online: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/063857258/publication/RU2639452C1?q=RU2639452C1> (accessed on 22 September 2023).
52. Diagnostic Technique for Urogenital Trichomoniasis. Available online: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/053294884/publication/RU2552320C1?q=RU2552320C1> (accessed on 22 September 2023).
53. Liquid Medium for the Diagnosis of Trichomoniasis “SKM-1-U”. Available online: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/055172028/publication/UA103506U?q=UA103506U> (accessed on 22 September 2023).
54. Detecção Multiplex da Candidíase Vulvovaginal, Tricomoníase e Vaginose Bacteriana. Available online: [- 55. Multiplex Detection of Vulvovaginal Candidiasis, Trichomoniasis and Bacterial Vaginosis. Available online: \[https://www.ic.gc.ca/opic-cipo/cpd/eng/patent/2982467/summary.html?type=number\\\_searchCtabs1Index=tabs1\\\_1\]\(https://www.ic.gc.ca/opic-cipo/cpd/eng/patent/2982467/summary.html?type=number\_searchCtabs1Index=tabs1\_1\) \(accessed on 22 September 2023\).
- 56. Multiplex Detection of Vulvovaginal Candidiasis, Trichomoniasis and Bacterial Vaginosis \(20180291431\). Available online: <https://ppubs.uspto.gov/pubwebapp/static/pages/ppubsbasic.html> \(accessed on 22 September 2023\).
- 57. Assay for Detecting \*Chlamydia trachomatis\*, \*Neisseria gonorrhoeae\*, \*Trichomonas vaginalis\*, and \*Mycoplasma genitalium\*. Available online: \[https://www.ic.gc.ca/opic-cipo/cpd/eng/patent/3088866/summary.html?query=ASSAY+FOR+DETECTING+CHLAMYDIA+TRACHOMATIS,+NEISSERIA+GONORRHOEAE,+TRICHOMONAS+VAGINALIS,+AND+MYCOPLASMA+GENITALIUMCtype=basic\\\_search\]\(https://www.ic.gc.ca/opic-cipo/cpd/eng/patent/3088866/summary.html?query=ASSAY+FOR+DETECTING+CHLAMYDIA+TRACHOMATIS,+NEISSERIA+GONORRHOEAE,+TRICHOMONAS+VAGINALIS,+AND+MYCOPLASMA+GENITALIUMCtype=basic\_search\) \(accessed on 22 September 2023\).
- 58. Assay for Detecting \*Chlamydia trachomatis\*, \*Neisseria gonorrhoeae\*, \*Trichomonas vaginalis\*, and \*Mycoplasma genitalium\* \(20190211379\). Available online: <https://ppubs.uspto.gov/pubwebapp/static/pages/ppubsbasic.html> \(accessed on 22 September 2023\).
- 59. Compositions and Methods for Detection of \*Trichomonas vaginalis\*. Available online: \[https://www.ic.gc.ca/opic-cipo/cpd/eng/patent/3025585/summary.html?query=COMPOSITIONS+AND+METHODS+FOR+DETECTION+OF+TRICHOMONAS+VAGINALISCtype=basic\\\_search\]\(https://www.ic.gc.ca/opic-cipo/cpd/eng/patent/3025585/summary.html?query=COMPOSITIONS+AND+METHODS+FOR+DETECTION+OF+TRICHOMONAS+VAGINALISCtype=basic\_search\) \(accessed on 22 September 2023\).
- 60. Compositions and Methods for Detection of \*Trichomonas vaginalis\* \(20170342508\). Available online: <https://ppubs.uspto.gov/pubwebapp/static/pages/ppubsbasic.html> \(accessed on 22 September 2023\).
- 61. Specific \*Trichomonas vaginalis\* Nested PCR \(Polymerase Chain Reaction\) Detection Kit. Available online: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/050524423/publication/CN103757108A?q=CN103757108A> \(accessed on 22 September 2023\).
- 62. Primer Composition, Application Thereof, \*Trichomonas vaginalis\* Detection Kit. Available online: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/059785450/publication/CN107142327A?q=CN107142327A> \(accessed on 22 September 2023\).
- 63. Methods of Detecting \*Trichomonas vaginalis\*. Available online: \[https://www.ic.gc.ca/opic-cipo/cpd/eng/patent/2953006/summary.html?query=METHODS+OF+DETECTING+TRICHOMONAS+VAGINALISCtype=basic\\\_search\]\(https://www.ic.gc.ca/opic-cipo/cpd/eng/patent/2953006/summary.html?query=METHODS+OF+DETECTING+TRICHOMONAS+VAGINALISCtype=basic\_search\) \(accessed on 22 September 2023\).
- 64. Methods of Detecting \*Trichomonas vaginalis\* \(20170183746\). Available online: <https://ppubs.uspto.gov/pubwebapp/static/pages/ppubsbasic.html> \(accessed on 22 September 2023\).
- 65. Diagnostic Kit for Diagnosing Vaginitis \(1020150102826\). Available online: <http://engpat.kipris.or.kr/engpat/biblioa.do?method>](https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detailCCodPedido=1433346CSearchParameter=1120170223791%20%20%20%20%20Resumo=CTitulo=)

=biblioFrame (accessed on 22 September 2023).

66. Oligonucleotides for Use in Determining the Presence of *Trichomonas vaginalis* in a Sample. Available online: [https://www.ic.gc.ca/opic-cipo/cpd/eng/patent/3144452/summary.html?query=OLIGONUCLEOTIDES+FOR+USE+IN+DETERMINING+THE+PRESENCE+OF+TRICHOMONAS+VAGINALIS+IN+A+SAMPLE&type=basic\\_search](https://www.ic.gc.ca/opic-cipo/cpd/eng/patent/3144452/summary.html?query=OLIGONUCLEOTIDES+FOR+USE+IN+DETERMINING+THE+PRESENCE+OF+TRICHOMONAS+VAGINALIS+IN+A+SAMPLE&type=basic_search) (accessed on 22 September 2023).
67. Oligonucleotides for Use in Determining the Presence of *Trichomonas vaginalis* in a Sample (20220307093). Available online: <https://ppubs.uspto.gov/pubwebapp/static/pages/ppubsbasic.html> (accessed on 22 September 2023).
68. Multiplex Detection of Nucleic Acids Using Mixed Reporters (20230220463). Available online: <https://ppubs.uspto.gov/pubwebapp/static/pages/ppubsbasic.html> (accessed on 22 September 2023).
69. Method and System for Diagnostic Testing (20170002432). Available online: <https://ppubs.uspto.gov/pubwebapp/static/pages/ppubsbasic.html> (accessed on 22 September 2023).
70. Methods and Compositions for Human Papillomaviruses and Sexually Transmitted Infections Detection, Identification and Quantification (20200385821). Available online: <https://ppubs.uspto.gov/pubwebapp/static/pages/ppubsbasic.html> (accessed on 22 September 2023).
71. Method for Detection of a Sexually Transmitted Infectious Pathogen (20230160021). Available online: <https://ppubs.uspto.gov/pubwebapp/static/pages/ppubsbasic.html> (accessed on 22 September 2023).
72. Arroyo, R.; Cárdenas-Guerra, R.E.; Figueroa-Angulo, E.E.; Puente-Rivera, J.; Zamudio-Prieto, O.; Ortega-López, J. *Trichomonas vaginalis* Cysteine Proteinases: Iron Response in Gene Expression and Proteolytic Activity. *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, 946787. [CrossRef]
73. Production of Anti TvMP50r Polyclonal Antibodies That Can Be Used in the Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* in Men. Available online: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/048290344/publication/WO2013070055A1?q=MX2012000112W> (accessed on 22 September 2023).
74. Production of a Low-Molecular-Weight Recombinant Metalloproteinase (50kDA) of *Trichomonas vaginalis* and Identification of the Gene That Codes for Said Low-Molecular-Weight Metalloproteinase (50kDA) That Is Expressed Differentially in the Presence of Zn<sup>2+</sup>. Available online: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/048290345/publication/WO2013070056A1?q=WO2013070056A1> (accessed on 22 September 2023).
75. Diagnosis and Therapeutic Methods for Treating *Trichomonas vaginalis* Infection by Protein TVCP29. Available online: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/048195103/publication/MX2011007531A?q=MX2011007531A> (accessed on 22 September 2023).
76. Trichosystatin-2 (TC-2) a Cysteine Proteinase Inhibitor TVCP39 of *Trichomonas vaginalis*. Available online: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/055959529/publication/MX2014010400A?q=MX2014010400A> (accessed on 22 September 2023).
77. Cysteine Proteinase TvCP4 as Therapeutic and Diagnosis Target of Virulence in Infection by *Trichomonas vaginalis*. Available online: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/052824735/publication/MX2013006126A?q=MX2013006126A> (accessed on 22 September 2023).
78. Diagnosis of Trichomonosis and Determination of Isolated Virulence of the *Trichomonas vaginalis* Parasite through the Quantitative Analysis of the Proteinase Cysteine 2, TvCP2. Available online: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/066823418/publication/MX2017013824A?q=MX2017013824A> (accessed on 22 September 2023).
79. Graves, K.J.; Novak, J.; Secor, W.E.; Kissinger, P.J.; Schwebke, J.R.; Muzny, C.A. A systematic review of the literature on mechanisms of 5-nitroimidazole resistance in *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology* **2020**, *147*, 1383–1391. [CrossRef]
80. Pyruvate-Ferredoxin Oxidoreductase (PFO) Adhesine Protein as a Target for Inhibiting the Adherence of *Trichomonas vaginalis* and as a Diagnosis and Vaccinal Target for Trichomoniasis. Available online: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/048741720/publication/MX2011011361A?q=MX2011011361A> (accessed on 22 September 2023).
81. Assay for *Trichomonas vaginalis* by Amplification and Detection of *Trichomonas vaginalis* AP65-1 Gene. Available online: <https://pss-system.cponline.cnipa.gov.cn/documents/detail?prevPageTit=changgui> (accessed on 22 February 2024).
82. Urine Specimen Analysis Method and Urine Specimen Analyzer (20230266298). Available online: <https://ppubs.uspto.gov/pubwebapp/static/pages/ppubsbasic.html> (accessed on 22 September 2023).
83. Device and Method for Motility-Based Label-Free Detection of Motile Objects in a Fluid Sample (20210374381). Available online: <https://ppubs.uspto.gov/pubwebapp/static/pages/ppubsbasic.html> (accessed on 22 September 2023).
84. Motion Based Pathogen Detection Using a Fluidic Imager (20210398296). Available online: <https://ppubs.uspto.gov/pubwebapp/static/pages/ppubsbasic.html> (accessed on 22 September 2023).
85. Personal Care Products with Visual Indicator of Vaginitis (20140087417). Available online: <https://ppubs.uspto.gov/pubwebapp/static/pages/ppubsbasic.html> (accessed on 22 September 2023).
86. Strings of Epitopes Useful in Diagnosing and Eliciting Immune Responses to Sexually Transmitted Infection (20190154689). Available online: <https://ppubs.uspto.gov/pubwebapp/static/pages/ppubsbasic.html> (accessed on 22 September 2023).

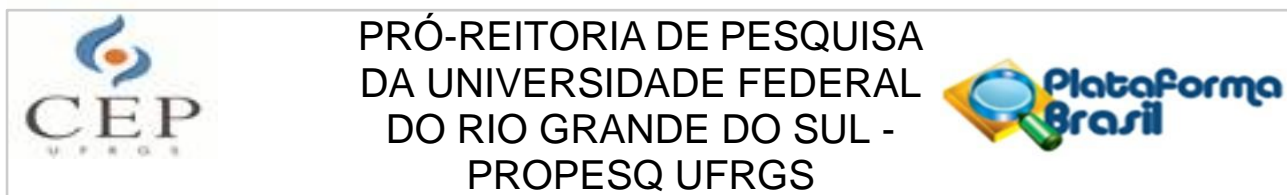


## **Anexo 2:** Lista de artigos publicados na vigência do mestrado

- 1) Vargas Rigo G, **Gomes Cardoso F**, Bongiorno Galego G, da Rosa DF, Dos Santos ALS, Tasca T. Metallopeptidases as Key Virulence Attributes of Clinically Relevant Protozoa: New Discoveries, Perspectives, and Frontiers of Knowledge. *Curr Protein Pept Sci*. 2023;24(4):307-328. doi: 10.2174/1389203724666230306153001.
- 2) Rigo GV, **Cardoso FG**, Devereux M, McCann M, Macedo AJ, Santos ALS, Tasca T. Antimicrobial and Antibiofilm Activities of Copper (II)-1,10-phenanthroline-5,6-dione Against Commensal Bacteria and Fungi Responsible for Vaginal Microbiota Dysbiosis. *Curr Microbiol*. 2023 Oct 23;80(12):383. doi: 10.1007/s00284-023-03500-z.
- 3) Rigo GV, **Cardoso FG**, Pereira MM, Devereux M, McCann M, Santos ALS, Tasca T. Peptidases Are Potential Targets of Copper (II)-1,10-Phenanthroline-5,6-dione Complex, a Promising and Potent New Drug against *Trichomonas vaginalis*. *Pathogens*. 2023 May 22;12(5):745. doi: 10.3390/pathogens12050745.
- 4) Freitas MD, **Cardoso FG**, Rigo GV, de Melo Machado H, Bazzo ML, Tasca T. Detection of *Trichomonas vaginalis* by Allplex™ STI Essential Assay (Seegene) in clinical samples from the Brazilian public health system users. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2024 Jan;43(1):167-170. doi: 10.1007/s10096-023-04694-7.



### Anexo 3: Parecer Consubstanciado do CEP



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Padronização da co-cultura de *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans* e *Lactobacillus crispatus*: um novo método para caracterização da atividade antimicrobiana

**Pesquisador:** Tiana Tasca

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 76336623.3.0000.5347

**Instituição Proponente:** Faculdade de Farmácia

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 6.742.238

#### Apresentação do Projeto:

Apresentação do Projeto: As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do documento Informações Básicas da Pesquisa n.º 2259421, datado em 26/03/2024.

#### RESUMO:

A tricomoníase é a infecção sexualmente transmissível (IST) de origem não viral mais comum no mundo, sendo transmitida pelo agente etiológico *Trichomonas vaginalis*. É estimada uma incidência de 156 milhões de novos casos anuais em todo mundo. A infecção tem manifestações clínicas amplas, podendo ser desde um quadro assintomático até uma severa vaginite. Além disso, há a associação da tricomoníase com o aumento da transmissão e aquisição de HIV/AIDS, entretanto, a tricomoníase não é notificável e não existe sistema de vigilância e detecção de isolados resistentes ao tratamento. Os únicos fármacos recomendados para tratar a infecção provêm da mesma classe dos 5-nitroimidazóis, os quais apresentam falhas terapêuticas, relacionadas com a resistência e/ou falta de adesão ao tratamento pelos pacientes. Outro agente causador da vaginite é *Candida albicans*, fungo dimórfico constituinte da microbiota vaginal normal de muitas mulheres, mas devido a diversos fatores como imunidade e estresse podem causar candidíase vulvovaginal (CVV). Assim como a

**Endereço:** Av. Paulo Gama, n° 110 - Sala 311 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro

**Bairro:** Farroupilha

**CEP:** 90.040-060

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3308-3787

**E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
DA UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL -  
PROPESQ UFRGS



Continuação do Parecer: 6.742.238

tricomoníase, o tratamento farmacológico para a CVV está ligado com poucos medicamentos aprovados para o uso e casos de isolados resistentes são muito comuns. Além disso, essa infecção está associada a casos de recorrência. Em contrapartida, a microbiota vaginal apresenta diferentes mecanismos para a proteção e inibição de proliferação de microrganismos patogênicos e oportunistas, onde há a prevalência de espécies de *Lactobacillus*, sendo a espécie *L. crispatus* a mais predominante. Nosso grupo de pesquisa tem desenvolvido estudos pré-clínicos relacionados com novas moléculas há mais de dez anos, sendo que complexos metálicos com 1,10-fenantrolina-5,6-diona (fendiona) apresentam atividade muito promissora contra *T. vaginalis* e *C. albicans*. No entanto, ainda não existe uma metodologia padronizada da co-cultura de *T. vaginalis*, *L. crispatus*, *C. albicans* e células vaginais, a qual pode ser uma plataforma que simula o microambiente vaginal, com o intuito de ser uma ferramenta que caracterize a atividade antimicrobiana e citotóxica de novos fármacos, direcionando apenas as moléculas mais promissoras para estudos em modelos animais e clínicos.

#### INTRODUÇÃO:

O protozoário flagelado extracelular *Trichomonas vaginalis* é o agente etiológico da tricomoníase, a infecção sexualmente transmissível (IST) de origem não viral mais comum no mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2016 foram estimados 156 milhões novos casos da infecção no mundo todo (ROWLEY et al., 2019). Nos Estados Unidos em 2018 foi estimada uma incidência de 6,9 milhões de novos casos (LEWIS et al., 2021). Entretanto, esses dados são subestimados, isso se deve à: pelo menos 80% dos casos serem assintomáticos (Workowski et al., 2021); existem poucos estudos de prevalência de boa qualidade publicados na literatura; principal técnica utilizada para o diagnóstico, exame direto a fresco, apresenta baixa sensibilidade; além disso, essa doença não é notificável e não existe sistema de vigilância e detecção de isolados resistentes ao tratamento, não havendo ênfase dos programas de saúde pública de controle de IST (McCLELLAND, 2008; VAN GERWEN et al., 2021).

As manifestações clínicas são variáveis, pois pacientes que apresentam a infecção podem ser sintomáticos ou assintomáticos, sendo que os sintomas e a severidade da doença variam entre os sexos (VAN GERWEN e MUZNY, 2019). A respeito disso, os homens geralmente apresentam uma infecção auto-limitada e transitória, entretanto quando há sintomas estão relacionados com uretrite purulenta, epididimite e prostatite (HIRT et al., 2015). Cabe ressaltar que com a permanência do protozoário no tecido prostático, complicações como infertilidade e formas

**Endereço:** Av. Paulo Gama, nº 110 - Sala 311 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro

**Bairro:** Farroupilha

**CEP:** 90.040-060

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3308-3787

**E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
DA UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL -  
PROPESQ UFRGS



Continuação do Parecer: 6.742.238

invasivas de câncer de próstata estão relacionadas com a infecção (BENCHIMOL et al., 2008; STARK et al., 2009). Em mulheres sintomáticas, a inflamação causada pelo protozoário é caracterizada por corrimento purulento e malcheiroso, irritação e prurido vulvar, dor abdominal e disúria, além de pontos hemorrágicos na mucosa vaginal ou cervical, acompanhada por edema e eritema, esse é um achado bastante característico da tricomoníase, conhecido com colpitis macularis ou cérvix com aspecto de morango (MENEZES et al., 2016). As complicações nas mulheres estão relacionadas com infertilidade, câncer cervical, doença inflamatória pélvica e complicações na gravidez (EDWARDS et al., 2016). Além disso, *T. vaginalis* facilita a transmissão e a aquisição de HIV/AIDS, o que suporta a epidemia de HIV em regiões que são endêmicas para tricomoníase (KISSINGER et al., 2013), por isso se faz necessário o desenvolvimento de novos fármacos eficazes para controlar a infecção e dessa forma diminuir o risco de transmissão do HIV.

O tratamento farmacológico da tricomoníase aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) é centrado em três fármacos pertencentes à classe dos 5-nitroimidazóis, metronidazol, tinidazol e secnidazol (WENDEL e WORKOWSKI, 2007; MUZNY e VAN GERWEN, 2022), os quais apresentam mecanismo de ação idêntico e são relacionados com efeitos adversos gastrointestinais, como náusea, vômito, cefaleia, insônia, vertigem e sonolência (MILLER e NYIRJESY, 2011), o que torna a adesão ao tratamento pelos pacientes prejudicada. Ainda, a sensibilidade dos fármacos tem sido significativamente diminuída devido a mecanismos relacionados com resistência aeróbia e anaeróbia. A resistência aeróbia ou clínica é associada à presença de oxigênio, em que ocorre a oxidação de grupos ativos, enquanto a resistência *in vitro* é o tipo anaeróbio induzido em laboratório, que está ligada à redução das enzimas ativas responsáveis pela ativação do fármaco (RIGO e TASCA, 2020; KULDA, 1999).

O fato da infecção por *T. vaginalis* aumentar a aquisição do HIV se deve a quatro condições: resposta pró-inflamatória na mucosa cérvicovaginal, supressão da imunidade inata da mucosa durante a infecção, enfraquecimento ou ruptura da mucosa cérvico-vaginal e alteração da microbiota vaginal normal e do pH normal (MAKAROVA et al., 2017). Especificamente, *T. vaginalis* tem diferentes mecanismos que explicam a potencialização do risco de aquisição do HIV, os quais são: dano na monocamada do epitélio hospedeiro; recrutamento de linfócitos CD4+ e macrófagos à mucosa vaginal e cervical; secreção de cisteína proteases que degradam o inibidor de protease leucocitária secretória, o qual tem papel de proteger as mucosas contra patógenos e na prevenção da transmissão do HIV (GILBERT et al., 2000; ALVAREZ-SÁNCHEZ et al., 2007).

**Endereço:** Av. Paulo Gama, nº 110 - Sala 311 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro

**Bairro:** Farroupilha

**CEP:** 90.040-060

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3308-3787

**E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
DA UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL -  
PROPESQ UFRGS



Continuação do Parecer: 6.742.238

Em vista disso, nosso grupo de pesquisa têm desenvolvido estudos pré-clínicos relacionados com novas moléculas há mais de dez anos, com contribuição significativa na busca de novos compostos tricomonocidas a partir de produtos naturais e derivados sintéticos (VIEIRA et al., 2015). Aqui destacamos a 1,10-fenantrolina-5,6-diona (fendiona), a qual é um composto baseado no fenantreno, metabólito secundário de plantas da família Orchidaceae (TÓTH et al., 2017). A fendiona também pode ser associada com complexos metálicos ( $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Ag}^{+}$ ) que está relacionada com propriedades antimicrobianas (McCANN et al., 2004). Nosso grupo encontrou atividade tricomonocida muito significativa de fendiona livre, cobrefendiona e prata-fendiona, mas aquele que apresentou a menor MIC (em inglês, minimum inhibitory concentration) para os diferentes isolados testados foi o cobre-fendiona. Além disso, o cobre-fendiona apresentou alto índice de seletividade para fibroblastos e hemácias, portanto é mais seletivo para o protozoário do que para células hospedeiras, e apresenta interação sinérgica com metronidazol (RIGO et al., 2019).

A eubiose vaginal é caracterizada pela prevalência de diversas espécies de *Lactobacillus*, que correspondem a quatro dos cinco tipos de comunidades-estados que fazem parte da microbiota vaginal (RAVEL et al., 2011). O domínio regido principalmente por *L. crispatus*, confere maior proteção contra infecções causadas por diferentes microrganismos, pois produzem substâncias antimicrobianas como: ácido láctico, bacteriocinas e peróxido de hidrogênio (KALIA et al., 2022). Com a perturbação da homeostase na microbiota vaginal há o aumento do risco de infecções oportunistas e facilita o estabelecimento de infecções sexualmente transmitidas, como a tricomoníase (BROTMAN et al., 2019). Além disso, a presença de *Candida* spp. na mucosa como um comensal (WILLEMS et al., 2020), pode representar outro fator de risco para o desenvolvimento de vaginite infecciosa, pois devido a um desequilíbrio da microbiota circundante, desenvolvimento de processos inflamatórios, uso de antibiótico de amplo espectro ou estados de imunodeficiência esse patógeno oportunista pode proliferar e causar candidíase vulvovaginal (CVV) (BROWN et al., 2012), a segunda causa mais comum de vaginite (ANDERSON et al., 2004). Os sintomas relacionados com a CVV são: prurido vaginal, dor durante o ato sexual, desconforto ao urinar e corrimento vaginal anormal (GONÇALVES et al., 2016). Aproximadamente 138 milhões de mulheres são afetadas por CVV recorrente, que é caracterizada por quatro ou mais episódios da infecção por ano (DENNING et al., 2018). Existem diferentes espécies de *Candida* que são responsáveis pela CVV, entretanto, *C. albicans* é a espécie mais relacionada com a vaginite (SANGAMITHRA et al., 2013). Assim como observado para a tricomoníase, candidíase também tem muitos casos de isolados resistentes

**Endereço:** Av. Paulo Gama, nº 110 - Sala 311 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro

**Bairro:** Farroupilha

**CEP:** 90.040-060

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3308-3787

**E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
DA UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL -  
PROPESQ UFRGS



Continuação do Parecer: 6.742.238

ao único tratamento oral aprovado, o fluconazol (BAUTERS et al., 2022) e essa infecção também não é notificável e não existe sistema de vigilância e detecção de isolados resistentes ao tratamento. As complicações devido ao tratamento ineficaz ou a falta deste são: doença inflamatória pélvica, distúrbios menstruais, infertilidade, gravidez ectópica, aborto espontâneo e aumento da suscetibilidade ao HIV (YANO et al., 2019). Ressalta-se ainda, casos de co-infecção de *T. vaginalis* e *C. albicans* são comuns e estão associados ao desconforto no local e aumento da morbidade, apresentando uma taxa de ocorrência de 14,3% em um estudo feito em uma cidade do México (LÓPEZ-MONTEON et al., 2013). Em contrapartida, existem poucos estudos que demonstram a relação entre esses microrganismos.

Neste contexto, o desenvolvimento de novas moléculas é de extrema importância para o tratamento da tricomoníase e candidíase vulvovaginal e no controle na disseminação do HIV no mundo. Para isso são necessárias diversas etapas de pesquisa para aprovar um fármaco para o uso terapêutico. Essas etapas são divididas em estudos pré-clínicos, onde testes *in vitro* e *in vivo* são realizados, e estudos clínicos. Dessa forma, a padronização de metodologias que tornem possível a co-cultura de *T. vaginalis*, *C. albicans*, *L. crispatus* e células vaginais são interessantes para tentar mimetizar o ambiente vaginal polimicrobiano que os agentes da vaginite enfrentam no sítio de infecção. Até o momento, em resultados prévios, vimos que o meio MRS pode ser utilizado para a co-cultura. Foi possível separar diferentes gates para cada microrganismo na citometria de fluxo, portanto comprovando a presença dos três microrganismos em co-cultura. Em resultados preliminares, vimos ainda que a co-cultura não altera os mecanismos de virulência, como capacidade de formar biofilme e da transição de levedura para hifas, de *C. albicans* (dados não publicados).

#### HIPÓTESE

A hipótese deste projeto é que a co-cultura de *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans*, *Lactobacillus crispatus* é uma plataforma que simula o microambiente vaginal.

#### METODOLOGIA

1. Cultivo de *Trichomonas vaginalis*: O isolado padrão da American Type Culture Collection (ATCC) 30236 do protozoário *T. vaginalis* será cultivado em meio TYM (Trypticase-yeast extract-maltose) (DIAMOND, 1957) suplementado com 10% de soro bovino adulto (SBA) e uma combinação de antibióticos estreptomicina e penicilina, a 37°C. Para o ensaio de co-cultura, a suspensão de trofozoítos será centrifugada e ressuspendida em caldo MRS (DE MAN et al.,

**Endereço:** Av. Paulo Gama, nº 110 - Sala 311 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro

**Bairro:** Farroupilha

**CEP:** 90.040-060

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3308-3787

**E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
DA UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL -  
PROPESQ UFRGS



Continuação do Parecer: 6.742.238

1960) suplementado com 10% SBA.

2. Culturas de leveduras e bactérias: A cepa padrão (ATCC) de *Candida albicans* 24433 será cultivada em agar Sabouraud dextrose, por 24 horas a 37°C. A cepa padrão da bactéria *Lactobacillus crispatus* 7595, adquirida da Coleção de Culturas Tropical (CCT) da Fundação André Tosello (Curitiba, Paraná), será cultivada em caldo MRS por 48-72 horas à 37°C.

3. Cocultura microbiana com células vaginais: Para criar um ambiente *in vitro* que mimetiza o *in vivo* podemos adicionar células vaginais da linhagem HMVII (melanoma de epitélio vaginal) à co-cultura. Portanto, em uma microplaca de 96 poços serão adicionadas  $2 \times 10^4$  células/ml em meio RPMI-1640, a 37°C por 24h, para que no dia seguinte as células sejam adicionadas à co-cultura com as densidades já padronizadas de *T. vaginalis*, *C. albicans* e *L. crispatus*.

4. Efeito de fármacos de referência no tratamento de candidíase e tricomoníase na co-cultura: Para avaliar o efeito na cocultura de metronidazol, secnidazol e fluconazol, os fármacos para o tratamento de tricomoníase e candidíase, utilizaremos estes em concentrações que inibiam o crescimento de cada microrganismo e avaliamos o efeito nos outros dois microrganismos. Além disso, será possível avaliar a MIC (concentração inibitória mínima) de cada fármaco frente à *T. vaginalis* e *C. albicans* isolados, depois co-cultura.

5. Co-cultura como uma ferramenta de screening para atividade antimicrobiana de moléculas: Com a co-cultura padronizada, o objetivo final do projeto é fazer o screening de diferentes moléculas nesse modelo, além dos fármacos metronidazol, tinidazol e secnidazol.

6. Avaliação dos fatores de virulência do *T. vaginalis* após a co-cultura, será possível isolar o protozoário, para:

- Obtenção das amostras de sangue: Amostras de sangue humano fresco serão colhidas de participantes saudáveis com heparina. Os participantes incluirão seis docentes e técnicos de laboratório da Faculdade de Farmácia, UFRGS, de 18 a 60 anos de idade. Os participantes voluntários do projeto mediante concordância e assinatura do TCLE, a ser aplicado prévio ao momento da coleta. A coleta de sangue será realizada no Laboratório 509 da Faculdade de Farmácia, UFRGS. Serão realizadas no máximo duas coletas (volume de 10 ml) de cada

**Endereço:** Av. Paulo Gama, nº 110 - Sala 311 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro

**Bairro:** Farroupilha

**CEP:** 90.040-060

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3308-3787

**E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br





PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
DA UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL -  
PROPESQ UFRGS



Continuação do Parecer: 6.742.238

participante.

- Avaliar a capacidade hemolítica, determinada através do método de Hübner et al.(2016). As hemácias serão obtidas através de sangue heparinizado de doadores humanos saudáveis (projeto será submetido à avaliação ética do CEP/UFRGS). A suspensão de 1% de hemácias será incubada com o *T. vaginalis* que passou ou não pela co-cultura, por 24h. O sobrenadante é coletado e a absorbância medida em espectrofotômetro a 540 nm. Os resultados vão ser expressos em porcentagem de hemólise de cada amostra testada, comparando-se com a 100% de hemólise atribuída ao controle positivo (Triton X-100 1%);-

- Avaliar a capacidade de destruição de neutrófilos, os quais serão obtidos do isolamento pelo método de Ryu et al. (2004), de amostras sanguíneas heparinizadas de doadores saudáveis (projeto será submetido à avaliação ética do CEP/UFRGS). Para os experimentos,  $2 \times 10^6$  neutrófilos/mL serão estimulados com  $2 \times 10^6$  trofozoítos/mL que passaram ou não pela co-cultura durante 30 minutos. Portanto, será determinado o acúmulo de EROs por citometria de fluxo.

Metodologia de Análise de Dados:

Os resultados de três experimentos independentes serão expressos como média dos valores  $\pm$  o desvio padrão. Será utilizado o software GraphPad Prism6 para análise estatística dos resultados, através do teste t de Student e Análise de Variância de uma via (ANOVA). Valores iguais ou acima de 5% serão considerados estatisticamente significativos.

Desfecho Primário:

Este projeto contribui com o direcionamento de apenas as moléculas mais promissoras para estudos em modelos animais e clínicos.

Desfecho Secundário:

Este projeto permite a avaliação da relação dos microrganismos em co-cultura, além disso conseguimos determinar se os mecanismos de virulência de *Trichomonas vaginalis* e *Candida albicans* são modificados com a co-cultura.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

**Endereço:** Av. Paulo Gama, nº 110 - Sala 311 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro

**Bairro:** Farroupilha

**CEP:** 90.040-060

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3308-3787

**E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
DA UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL -  
PROPESQ UFRGS



Continuação do Parecer: 6.742.238

Os critérios de inclusão são: idade entre 18 e 60 anos e estar em boas condições de saúde.

#### CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Os critérios de exclusão são a rejeição em coletar sangue ou sensação de tontura, fraqueza e desmaio.

#### CRONOGRAMA:

Início do projeto em 15/04/2024

#### Orçamento previsto:

R\$ 15.000,00 (financiamento próprio).

#### Objetivo da Pesquisa:

##### OBJETIVO PRIMÁRIO:

O objetivo primário deste projeto é padronizar a co-cultura com o intuito de ser uma ferramenta que caracterize a atividade antimicrobiana e citotóxica de novos fármacos, direcionando apenas as moléculas mais promissoras para estudos em modelos animais e clínicos.

##### OBJETIVOS SECUNDÁRIOS:

1. Padronizar a co-cultura de *T. vaginalis*, *C. albicans* e *L. crispatus*;
2. Adicionar células epiteliais vaginais à co-cultura;
3. Investigar se há efeito das relações entre os microrganismos e células hospedeiras nos fatores de virulência de *T. vaginalis* e *C. albicans*;
4. Determinar a expressão gênica de enzimas relacionadas a mecanismos de resistência do *T. vaginalis* após a co-cultura.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

##### RISCOS:

Os riscos são mínimos, relacionados à coleta de sangue periférico venoso, e incluem dor e eventual surgimento de hematoma no local da punção. No entanto, os riscos serão minimizados, visto que a coleta é um procedimento de rotina realizado por pessoal habilitado e supervisionado por profissional da enfermagem. O participante não terá benefícios diretos, porém com sua participação no estudo contribuirá para o desenvolvimento deste projeto que

**Endereço:** Av. Paulo Gama, nº 110 - Sala 311 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro

**Bairro:** Farroupilha

**CEP:** 90.040-060

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3308-3787

**E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
DA UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL -  
PROPESQ UFRGS



Continuação do Parecer: 6.742.238

busca novos fármacos tricomonídeos. A partir das amostras de sangue doadas pelo participante será possível realizar experimentos para buscar novos medicamentos contra o parasito *Trichomonas vaginalis*, causador da DST tricomoníase. Não está previsto qualquer ressarcimento ou outra vantagem pela sua participação.

#### BENEFÍCIOS

Uma investigação aprofundada sobre a relação de *T. vaginalis* com microrganismos constituintes da microbiota e células epiteliais vaginais. Além disso, padronizar a co-cultura a fim de desenvolver uma plataforma que proporcione a avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* e citotóxica de novos fármacos.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

#### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Trata-se de uma resposta ao parecer consubstanciado CEP nº 6.624.557, datado em 25/01/2024:

##### 1. Critério de inclusão e exclusão

Solicita-se inserir, no projeto detalhado e na Plataforma Brasil, os critérios de inclusão e exclusão dos participantes da pesquisa, devendo estes ser apresentados de acordo com as exigências da metodologia a ser utilizada (Norma Operacional CNS n.º 001, de 2013, item 3.4.1.11). Ressalta-se que em pesquisas clínicas, critérios de inclusão são aqueles que determinam as características de entrada dos participantes na pesquisa. Por exemplo, idade, sexo/gênero, a presença (ou ausência) de alguma condição clínica. Por outro lado, critérios de exclusão não são o contrário/oposto aos critérios de inclusão. Critérios de exclusão são aqueles aplicados após a entrada do participante, os quais, pelos motivos (critérios) devem ser removidos ou não mais considerados na análise dos dados. Por exemplo, participante que faltou a uma avaliação, ou respondeu a um questionário de forma incompleta, etc. Os pesquisadores não apresentaram os critérios de exclusão. Solicita-se adequação.

RESPOSTA 1: Agradecemos o comentário e incluímos os critérios de inclusão e exclusão no

**Endereço:** Av. Paulo Gama, nº 110 - Sala 311 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro

**Bairro:** Farroupilha

**CEP:** 90.040-060

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3308-3787

**E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
DA UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL -  
PROPESQ UFRGS



Continuação do Parecer: 6.742.238

projeto e na Plataforma Brasil: Os critérios de inclusão são: idade acima de 18 anos e estar em boas condições de saúde. Os critérios de exclusão são a rejeição em coletar sangue ou sensação de tontura, fraqueza e desmaio.

ANÁLISE 1: Pendência parcialmente atendida. Nos Critérios de Inclusão as pesquisadoras informam que serão incluídos participantes acima de 18 anos, sem mencionar o limite superior de idade. Solicita-se ajuste nos critérios de inclusão ou na Metodologia. Solicita-se a inclusão da concordância e assinatura do TCLE (conforme versão 1 do projeto).

RESPOSTA 2: Agradecemos e realizamos a correção adicionando o limite de idade, 60 anos, que estava mencionado na frase acima conforme texto do projeto. Além disso, a inclusão da concordância e assinatura do TCLE também foi redigida de forma mais clara. Essas alterações estão marcadas em destaque amarelo no projeto.

ANÁLISE 2: Pendência atendida.

## 2. Metodologia

Solicita-se inserir, no projeto detalhado, a descrição da forma de abordagem ou plano de recrutamento dos potenciais participantes de pesquisa (Norma Operacional CNS n.º 001, de 2013, item 3.4.1.8).

RESPOSTA 1: Os participantes da pesquisa serão doadores de sangue para experimentos in vitro e incluirão seis docentes e técnicos de laboratório da Faculdade de Farmácia, UFRGS, de 18 a 60 anos de idade. Assim, tratando-se de público interno, a forma de abordagem será via mensagens de aplicativo de conversa (WhatsApp) e conversa presencial, perguntando se o indivíduo concorda em doar um pequeno volume de sangue (10 ml) para o teste com as hemácias e neutrófilos, in vitro.

ANÁLISE 1: Pendência parcialmente atendida. Nos Critérios de Inclusão as pesquisadoras informam que serão incluídos participantes acima de 18 anos, sem mencionar o limite superior de idade. Solicita-se ajuste nos critérios de inclusão ou na Metodologia (18 a 60 anos).

RESPOSTA 2: Pesquisadoras: Conforme resposta anterior, realizamos a correção adicionando o limite de idade, 60 anos, que estava mencionado na frase acima conforme texto do projeto.

ANÁLISE 2: Pendência atendida.

**Endereço:** Av. Paulo Gama, nº 110 - Sala 311 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro

**Bairro:** Farroupilha

**CEP:** 90.040-060

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3308-3787

**E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
DA UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL -  
PROPEAQ UFRGS



Continuação do Parecer: 6.742.238

6. TCLE

6.4. O TCLE deve assegurar, de forma clara e afirmativa, que o participante de pesquisa recebera uma via (E NÃO CÓPIA) do documento, assinada por ele (ou por seu representante legal) e pelo/a pesquisador/a (ou pela pessoa por ele delegada). Solicita-se adequação (Resolução CNS n.º 466, de 2012, item IV.5.d).

RESPOSTA 1: Obrigada pela correção, realizada no TCLE.

ANÁLISE 1: Pendência parcialmente atendida. O documento deve assegurar, de forma clara e afirmativa, que o participante de pesquisa receberá UMA VIA (e não uma cópia) do documento, assinada pelo PARTICIPANTE da pesquisa (ou seu representante legal) e pelo(a) pesquisador(a), e rubricada em todas as páginas por ambos (Resolução CNS 510/2016, art 17, inciso X).

RESPOSTA 2: Realizamos a inclusão no TCLE (marcado em amarelo).

ANÁLISE 2: Pendência atendida.

\* Orienta-se, por fim, atenção ao cronograma do estudo, uma vez que o projeto apresenta pendências e a coleta de dados está prevista para iniciar em 01/02/24. Prever tempo suficiente para a completa tramitação ética previamente ao início da coleta de dados.

Pesquisadoras:

RESPOSTA 2: Alteramos o cronograma do projeto para início em 15 de abril de 2024.

ANÁLISE 2: Pendência atendida.

Todas as pendências foram atendidas, não sendo observados óbices éticos nos documentos do estudo.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa e CEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS n.º 466, de 2012, e na Norma Operacional n.º 001, de 2013, do

**Endereço:** Av. Paulo Gama, nº 110 - Sala 311 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro

**Bairro:** Farroupilha

**CEP:** 90.040-060

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3308-3787

**E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
DA UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL -  
PROPESQ UFRGS



Continuação do Parecer: 6.742.238

CNS, manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa.

Reitera-se aos pesquisadores a necessidade de elaborar e apresentar os relatórios parciais e final da pesquisa, como preconiza a Resolução CNS/MS nº 466/2012, Capítulo XI, Item XI.2: "d".

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Aprovado.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_2259421.pdf	26/03/2024 14:56:42		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Projeto_TCLE_REVISADO_R2.pdf	25/03/2024 21:44:10	Tiana Tasca	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DE_PESQUISA_Fernanda_Cardoso_REVISADO_R2.pdf	25/03/2024 21:42:01	Tiana Tasca	Aceito
Outros	Respostas_parecer_CEP_UFRGS_6624557.pdf	25/03/2024 21:41:04	Tiana Tasca	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_Projeto_Fernanda_assinado.pdf	05/12/2023 10:00:08	Tiana Tasca	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

PORTO ALEGRE, 03 de Abril de 2024

Assinado por:

Patrícia Daniela Melchiors Angst  
(Coordenador(a))

**Endereço:** Av. Paulo Gama, nº 110 - Sala 311 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro

**Bairro:** Farroupilha

**CEP:** 90.040-060

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3308-3787

**E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br