

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**Avaliação da formação de biofilme e da patogenicidade de isolados de
Candida spp. de pacientes de Unidades Básicas de Saúde de Porto Alegre.**

Julyana Pezzi de Oliveira

Porto Alegre, 16 de novembro de 2011.

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

Avaliação da formação de biofilme e da patogenicidade de isolados de *Candida* spp. de pacientes de Unidades Básicas de Saúde de Porto Alegre.

Julyana Pezzi de Oliveira

Orientador Prof. Dr. Alexandre M. Fuentefria

Porto Alegre, 16 de novembro de 2011.

“O que deve caracterizar a juventude é a modéstia, o pudor, o amor, a moderação, a dedicação, a diligência, a justiça, a educação. São estas as virtudes que devem formar o seu caráter.”

Sócrates

AGRADECIMENTOS

Ao professor Alexandre M. Fuentefria pela oportunidade da orientação neste trabalho de conclusão de curso, dedicação, amizade, paciência e pelo exemplo de ética e competência.

À professora Luciane Noal Calil pelo incentivo e carinho durante os anos de orientação em Extensão.

À minha querida amiga e colaboradora Amanda Gomes, pela atenção, carinho, paciência e ajuda.

À família do departamento de análises citológicas e micológicas: Amanda, Roberta, Nathalia, Suelen, Maísa, Taísa, Igor, Simone, Rosana, Fernanda, professoras Luciane e Andréia pela ajuda, risadas e conversas que tornaram meus dias muito mais agradáveis.

A todos os colegas, professores e funcionários do Departamento de Análises, especialmente aos funcionários do laboratório.

A todos meus amigos, de perto ou de longe, pela compreensão e apoio.

À minha família por toda paciência, carinho, apoio, força e incentivo.

À UFRGS, pelo ensino público gratuito e de excelência, à sociedade por quitar seus impostos propiciando assim a alunos busca pelo sonho da graduação, e finalmente à PROEXT pelas bolsas-extensões concedidas, que me propiciaram auxílio financeiro enquanto eu estudava e com as quais aprendi a importância do trabalho voltado para o ensino das crianças e jovens e da valorização do ser humano em toda sua extensão.

APRESENTAÇÃO

Os resultados obtidos com este trabalho estão apresentados sob a forma de artigo científico. Este contém os seguintes tópicos: Introdução, Objetivos, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências e será submetido ao Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, quando da aprovação da banca avaliadora do Trabalho de Conclusão de Curso, estando de acordo com suas normas (anexadas ao final do trabalho).

Os experimentos foram realizados no laboratório de Análises Micológicas do Departamento de Análises da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

ÍNDICE

1. ARTIGO CIENTÍFICO.....	VIII
2. ANEXO.....	27

1. ARTIGO CIENTÍFICO

Avaliação da formação de biofilme e da patogenicidade de isolados de *Candida* spp. de pacientes de Unidades Básicas de Saúde de Porto Alegre.

Artigo a ser submetido para publicação no *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*

Avaliação da formação de biofilme e da patogenicidade de isolados de *Candida* spp. de pacientes de Unidades Básicas de Saúde de Porto Alegre.

Julyana Pezzi de Oliveira^{a,b}, Amanda Gomes^{a,b}, Nathalia Leal Moreira^{a,b} e

Alexandre M. Fuentria^{a,c}

^a Discente da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

^b Grupo de Pesquisa em Micologia Aplicada, Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

^d Professor do Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

*Autor Correspondente: Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Departamento de Análises, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Avenida Ipiranga 2752, Bairro Santana 90610-000 Porto Alegre, RS - Brasil

e-mail: alexmf77@gmail.com

Avaliação da formação de biofilme e da patogenicidade de isolados de *Candida* spp. de pacientes de Unidades Básicas de Saúde de Porto Alegre.

RESUMO

INTRODUÇÃO: a candidíase vulvovaginal (CVV) é uma das patologias mais frequentes na prática diária em ginecologia e sua incidência tem aumentado drasticamente, tornando-a a segunda infecção genital mais freqüente nos Estados Unidos e no Brasil.

OBJETIVO: caracterizar a virulência e epidemiologia de cepas de *Candida* spp. provenientes de pacientes com candidíase vulvovaginal (CVV) atendidas em quatro Unidades Básicas de Saúde (UBSs) da cidade de Porto Alegre entre março de 2010 a março de 2011, em exames preventivos de rotina.

MÉTODOS: estudo epidemiológico transversal, no qual avaliou-se, primeiramente, fatores de patogenicidade ligados à capacidade de colonização da mucosa vaginal, através dos testes de formação de tubo germinativo, pseudo-hifa e biofilme nos 25 isolados de *Candida* spp. armazenados na micoteca da Faculdade de Farmácia da UFRGS, originários de 139 amostras de pacientes com CVV proveniente de UBSs, já previamente identificadas (15 isolados de *C. albicans*, 5 de *C. tropicalis*, 3 de *C. glabrata* e 2 de *C. krusei*). Posteriormente, realizou-se um cruzamento de dados pertinentes às características das amostras, obtidas de questionários respondidos pelas pacientes, com o objetivo de estimar os fatores de risco correlacionados com o isolamento de cepas nas amostras. Para a análise estatística, utilizou-se o teste não paramétrico U de Mann-Whitney, para variáveis quantitativas e o teste Binomial para variável binária, com nível de significância de 5%, utilizando o programa SPSS versão 18.

RESULTADOS: foi constatada prevalência de 60% de espécies *C. albicans* em relação às *C.não-albicans* nos isolados utilizados; com formação de tubo germinativo em 80% dos isolados de *C. albicans* e pseudo-hifa, em cerca de 93,3% dos mesmos. Em *C. tropicalis* ocorreu formação somente de tubo germinativo (60%) e nenhuma pseudo-hifa. Já em *C. krusei*, 100% das amostras formaram somente pseudo-hifa. Quanto a capacidade de expressar adesinas ou formar biofilme, os isolados foram classificados quanto às categorias não-formador, fraco, médio e forte formador, obtendo-se 10 (40%) de fraco-formadores, 10 (40%) de médio-formadores, 3 (12%) de forte-formadores e 2 (8%) de não-formadores, distribuídas percentualmente nas quatro espécies de *Candida spp.*, de forma bastante heterogênea nas UBSs selecionadas. Para a análise da significância estatística entre as variáveis estudadas, verificou-se que somente foi encontrada diferença significativa com relação à variável quantitativa uso de anticoncepcional, com relação aos testes de formação de tubo germinativo, pseudo-hifa e biofilme.

CONCLUSÕES: aspectos predisponentes do hospedeiro e virulência dos agentes causais, ainda não estão totalmente esclarecidos com relação à nova distribuição etiológica das espécies envolvidas na candidíase vulvovaginal. Embora todos os isolados de *Candida* tenham expressado, ao menos, um dos três fatores de virulência estudados, o estudo apenas aponta o uso de anticoncepcional pelas pacientes como fator relacionado com o potencial de virulências das cepas.

Palavras-Chave: Candidíase vulvovaginal, *Candida albicans*, *Candida não-albicans*, tubo germinativo, pseudo-hifa, biofilme.

ABSTRACT

PURPOSE: to characterize the epidemiology and virulence of strains of *Candida* spp. from patients with vulvovaginal candidiasis treated in four Basic Health Units in Porto Alegre city in routine preventive examinations.

METHODS: a cross-sectional study developed in two steps: first, tests were classic germ-tube formation, pseudo-hyphae and biofilm in 25 isolates of *Candida* spp. stored in the mycology collection of the Faculty of Pharmacy, UFRGS, originating in the collection of 139 CVV samples from UBSs (2010-2011), previously identified (15 isolates of *C. albicans*, 5 of *C. tropicalis*, 3 of *C. glabrata* and 2 of *C. krusei*) and then proceeded with, exchange of data relevant to the variables considered risk factors, obtained from the completion of questionnaires by patients with the results of experiments that characterize the pathogenicity of isolates of *Candida* spp. through the identification tests described above. For statistical analysis, we used the nonparametric Mann-Whitney U, for quantitative variables and the Binomial test for paired variables, with significance level of 5% using SPSS version 18.

RESULTS: a prevalence of 60% of species *C. albicans* in relation to non-*C. albicans* species isolates used, with germ-tube formation in 80% of the isolates of *C. albicans* and pseudo-hyphae, at about 93.3% of them. In *C. tropicalis* only germ tube formation (60%) and no pseudo-hyphae, as in *C. krusei*, 100% of the samples formed only pseudo-hyphae and formed no germ tubes, while in *C. glabrata*, 100% of the strains tested negative for both germ tubes and for pseudo-hyphae. As the biofilm isolates classified according to the categories non-trainer, weak, medium and strong trainer, obtaining 10 (40%) of low-trainers, 10 (40%) of medium-trainers, 3 (12%) of strong-trainers and 2 (8%) of non-trainers,

proportionally distributed in the four species of *Candida* spp., quite heterogeneous in selected UBSs. For the analysis of statistical significance between the variables studied, it was found that significant differences were found regarding contraceptive quantitative variable with respect to test germ-tube formation ($p = 0.007385$), pseudo-hyphae ($p\text{-value} = 0.00149$) and biofilm ($p\text{-value} = 0.0004883$), for all other no significance was found.

CONCLUSIONS: realization of the importance of testing of germ-tube formation, pseudo-hyphae and biofilmas a method of easy, fast and secure identification, the time taken to verify the pathogenicity of the isolates in relation to vulvovaginal candidiasis. And check that can not be said, indeed, for these variables, with the exception of the variable contraceptive, andt he observation of the formation of structures indicative of pathogenicity (germ tubes, pseudo-hyphae and biofilm), which use / experience represents significant difference with respect to its non-use/experience regarding the development of VVC.

Keywords: vulvovaginal candidiasis, *Candida-albicans*, *Candida non-albicans*, germ tubes, pseudo-hyphae, biofilm.

INTRODUÇÃO

A candidíase vulvovaginal é um distúrbio ocasionado pelo crescimento anormal de fungos leveduriformes na mucosa do trato genital feminino⁽⁴⁰⁾, sob determinadas condições pré-disponentes do hospedeiro que alteram o ambiente vaginal⁽¹⁴⁾, tais como imunossupressão, *diabetes mellitus*, gestação⁽²⁷⁾, contracepção oral e terapia de reposição hormonal, sendo as altas doses de estrogênio consideradas fatores de risco para o desenvolvimento da doença^(36,38). Assim como o uso de antibióticos de amplo espectro, uso crônico de corticóides, práticas sexuais, hábito de usar roupas muito justas, higiene pessoal inadequada e dieta alimentar excessivamente ácida⁽²²⁾.

Inflamação da mucosa genital, que compromete principalmente a vulva e a vagina, a candidíase vulvovaginal caracteriza-se clinicamente pela ocorrência de prurido vulvar intenso, leucorréia, dispareunia, disúria, edema e eritema vulvovaginal^(4,39). Trata-se de uma patologia causada por leveduras comensais pertencentes ao gênero *Candida*, que habitam além da mucosa vaginal, também as mucosas oral, digestiva e respiratória^(2,9,40).

Dentre as espécies de *Candida* comumente isoladas responsáveis pelos casos de candidíase vulvovaginal, cerca de 80 a 90% são devidos a *C.albican*^(7,10,20,27); 20% a 10%, a outras espécies denominadas *Candida* não-*albicans* (*C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis*, *C.lusitaniae*), sendo a *C. glabrata*^(4,6,25) e a *C. tropicalis*⁽²⁸⁾ as próximas em frequência. Pesquisas recentes demonstram que em algumas populações a frequência de isolamento de leveduras de *Candida* não-*albicans* tem

aumentado⁽⁹⁾, sendo responsável por cerca de 60% de fungemia⁽³⁾, o que é atribuído, por alguns, ao uso inadequado de antimicóticos^(10,28).

Estudos apontam que 75% das mulheres adultas apresentam, pelo menos, um episódio de candidíase vulvovaginal em sua vida, sendo que destas, 40 a 50% vivenciarão novos episódios e 5% atingirão a forma recorrente, definida usualmente como a ocorrência de quatro ou mais episódios no período de 12 meses^(19,24). Além do que, infelizmente, estas pacientes não se beneficiarão de uma diminuição dos episódios sintomáticos com o passar da idade⁽¹⁹⁾, além de apresentarem, uma prevalência mais elevada de *C. glabrata*, menos sensível às drogas imidazólicas, comumente utilizadas no tratamento primário e recorrente⁽³¹⁾.

A capacidade dos microorganismos de aderirem a células, tecidos ou superfícies em geral, é um pré-requisito fundamental na colonização e desenvolvimento do processo infeccioso⁽²⁾. Quando essa adesão se dá em células eucarióticas, é mediada por adesinas, estruturas da superfície do microrganismo que interagem com receptores específicos nas células eucarióticas^(13,28).

Desse modo, dada a relevância da aderência no desenvolvimento do processo infeccioso na mucosa vulvovaginal, a avaliação da capacidade dos isolados em formar biofilme é uma importante ferramenta na caracterização da patogenicidade do agente infectante⁽⁵⁾. O biofilme é composto de estruturas multicelulares que aderem a superfícies através das células basais planctônicas⁽⁸⁾, na tentativa de adaptarem-se a uma série de condições desfavoráveis tais como resposta imune do hospedeiro, privação de nutrientes e estresse ambiental⁽²³⁾, proporcionando à comunidade microbiana aumento da resistência às defesas do hospedeiro e aos agentes antimicrobianos^(12,27).

O gênero *Candida* apresenta-se tanto sob formas leveduriformes (blastocónidios), associadas à colonização assintomática em hospedeiros, quanto na forma de pseudo-hifas e tubo germinativo quando em processos de infecção celular no hospedeiro⁽³⁷⁾. O tubo germinativo é formado a partir de células que desenvolveram prolongamentos celulares em condições especiais de nutrientes e oxigênio, apresentando ausência de septos paralelos e de constrição no pescoço da célula-mãe⁽²¹⁾, estando mais comumente presente em culturas de *C. albicans* e *C. dubliniensis*⁽¹⁶⁾. Entretanto isolados altamente virulentos de *C. tropicalis* e *C. krusei* podem expressar também esse fator de virulência^(21,34,35). Mutantes incapazes de produzir hifas perdem a virulência de seus parentais⁽¹⁸⁾, o que reforça a evidência de que estas estruturas representam formas de crescimento diferenciadas associadas à adesão, formação de biofilme, penetração em tecidos, órgãos e colonização, imprescindíveis, portanto ao consequente estabelecimento de infecções⁽¹⁵⁾.

OBJETIVOS

Devido à relevância da alta incidência de infecções vulvovaginais por *Candida* sp. cada vez mais virulentas e de difícil tratamento, o objetivo deste estudo foi caracterizar a virulência e epidemiologia de cepas de *Candida* spp. provenientes de pacientes com candidíase vulvovaginal atendidas em quatro Unidades Básicas de Saúde da cidade de Porto Alegre, em exames preventivos de rotina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado um estudo de caráter epidemiológico do tipo seccional ou transversal, na cidade de Porto Alegre, RS, Brasil, com 139 pacientes que procuraram as Unidades Básicas de Saúde (Bananeiras, Centro de Saúde Modelo, IAPI e Vila dos Comerciários), atendimento público, para a realização de consulta de rotina, exame Preventivo do Câncer de Colo do Útero, no período de 2010 a 2011.

O projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Prefeitura Municipal de Porto Alegre, recebendo parecer favorável (processo número 001.022426.10.8). Cada participante, após ter sido esclarecida sobre a pesquisa, expressou seu consentimento, por escrito, através de um termo de consentimento livre e esclarecido.

Os dados a respeito das pacientes foram obtidos por meio de entrevistas, no momento da consulta, com questionários padronizados compreendendo perguntas estruturadas com relação a dados demográficos e clínicos e outras questões pertinentes às variáveis envolvidas consideradas fatores de risco ao desenvolvimento de candidíase vulvovaginal: idade, se fumante, número de parceiros sexuais, se utiliza anticoncepcional, se já esteve grávida. Também foram incluídos na pesquisa os resultados dos exames citológicos das pacientes realizados no laboratório de Citologia e Análises Clínicas da UFRGS com relação ao diagnóstico de possível inflamação e epitélio representativo.

Para o presente estudo foram cruzados dados pertinentes às variáveis obtidas do preenchimento dos questionários e os resultados dos experimentos

que caracterizam a patogenicidade dos isolados de *Candida spp.*, através dos testes de formação do tubo germinativo, pseudo-hifa e biofilme.

1. Aquisição das amostras

Os testes foram realizados utilizando-se os 25 isolados de *Candida spp.* depositados na micoteca do Laboratório de Micologia Aplicada da Faculdade de Farmácia da UFRGS, provenientes da coleta de secreção cérvico-vaginal das 139 pacientes das quatro unidades básicas de saúde, de Porto Alegre, acima citadas, obtidas durante os anos de 2010 a 2011. Os 25 isolados de *Candida spp.* estão distribuídos entre as quatro principais espécies, sendo 15 isolados de *C. albicans*, 5 de *C. tropicalis*, 3 de *C. glabrata* e 2 de *C. krusei*.

2. Avaliação da formação de tubos germinativos e pseudo-hifas nos isolados de *Candida spp.*

Foi avaliada a capacidade de formação de tubo germinativo e pseudo-hifa em *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. As amostras foram inicialmente repicadas em meio Ágar Saboraud com Cloranfenicol para, posteriormente, a partir de uma alçada da colônia isolada, obter-se uma suspensão de 10^6 células/mL em solução salina. Uma alíquota de 20 μ L foi aplicada em 0,5mL de soro humano, gentilmente cedido pelo laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFRGS, contidos em eppendorfs previamente estéreis. O tubo foi levado à estufa por 3h à 35 °C e, posteriormente, a suspensão foi homogeneizada.

Após incubação, 20 µL da mistura foram interpostos entre lâmina e lamínula para visualização direta em microscópio verificando se houve ou não a formação de tubo germinativo e de pseudo-hifas.

3. Formação de Biofilme

O perfil de aderência dos fungos foi determinado através do teste de formação de biofilme em microplacas de poliestireno de 96 poços, de acordo com modificações sobre a técnica descrita por Stepanovic *et al*⁽³³⁾, na qual o ensaio foi realizado em triplicata. Para tal, as linhagens foram cultivadas primeiramente em Ágar-Saboraud por 24h a 35°C, em seguida preparou-se o inóculo na concentração de 10⁶ cel/mL. Alíquotas de 20µL da suspensão foram transferidas para cada poço das microplacas e completadas com 180 µL de caldo triptose de soja (TSB), as quais em seguida foram incubadas por 48h a 35°C. Após incubação, a cultura foi cuidadosamente aspirada com pipeta multicanal sem encostar as ponteiros nas paredes internas de cada poço e, posteriormente lavados três vezes com água destilada estéril para remoção das células fracamente aderidas. Após esta etapa, adicionou-se 150 µL de metanol por 20 min aos poços, invertendo-se as placas e deixando-as secarem por 30 min, para só então serem coradas com 150 µL de Cristal Violeta 0,5% por 15 min à temperatura ambiente. Por fim, ressuspendeu-se o corante com 150 µL de etanol, deixando as placas em repouso, fechadas, por 30 min. A taxa de aderência da levedura foi determinada pelo método espectrofotométrico, através da medida da absorbância em leitor de placas de Elisa a 570 nM. Classificou-se a leitura da formação de biofilme como forte (> 0,280 OD), médio (0,170-0,279 OD), fraco

(0,070-0,170 OD) e não-formador (<0,070 OD). Para a realização dos experimentos foi utilizada uma cepa-controle, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, forte formadora de biofilme em microplaca de poliestireno.

4. Análise estatística

A avaliação estatística analisou o cruzamento de dados epidemiológicos dos isolados de *Candida* com a sua caracterização da virulência, sendo empregado o teste não paramétrico U de Mann-Whitney, semelhante ao teste paramétrico T de Student para variáveis quantitativas. Foi empregado também o teste Binomial para comparação entre as proporções quando a variável era binária. Dado que o tamanho da amostra é relativamente baixo (n=25) houve a necessidade de utilizar estatística não-paramétrica. Considerou-se para a análise estatística um nível de significância de 5%. Todas as análises estatísticas utilizaram o programa SPSS versão 18.

RESULTADOS

Em uma análise retrospectiva dos dados de distribuição percentual dos resultados das 139 culturas vaginais advindas dos postos de saúde, observou-se que apenas 25 (18%) apresentaram-se positivos para *Candida spp.* Cabe aqui ressaltá-los, uma vez que a totalidade dos isolados foi utilizada em nossos testes, sendo diagnosticado *C. albicans* (60%) e o restante de espécies *Candida* não-*albicans*: *C. tropicalis* (20%), *C. glabrata* (12%) e *C. krusei* (8%).

A análise do número absoluto de isolados que formaram tubo germinativo e pseudo-hifa (Figura 1), mostrou que dos isolados de *C. albicans*, cerca de 80% formaram tubo germinativo e 93,3% formaram pseudo-hifa, em *C. tropicalis* cerca de 60% formaram somente tubo germinativo e nenhum isolado formou pseudo-hifa, já em *C. krusei*, 100% das amostras formaram somente pseudo-hifa e nenhuma amostra formou tubo germinativo, enquanto que nos isolados de *C. glabrata*, 100% das cepas apresentaram resultados negativos tanto para tubo germinativo quanto para pseudo-hifa, sendo que este último já era esperado, conforme dados literários.

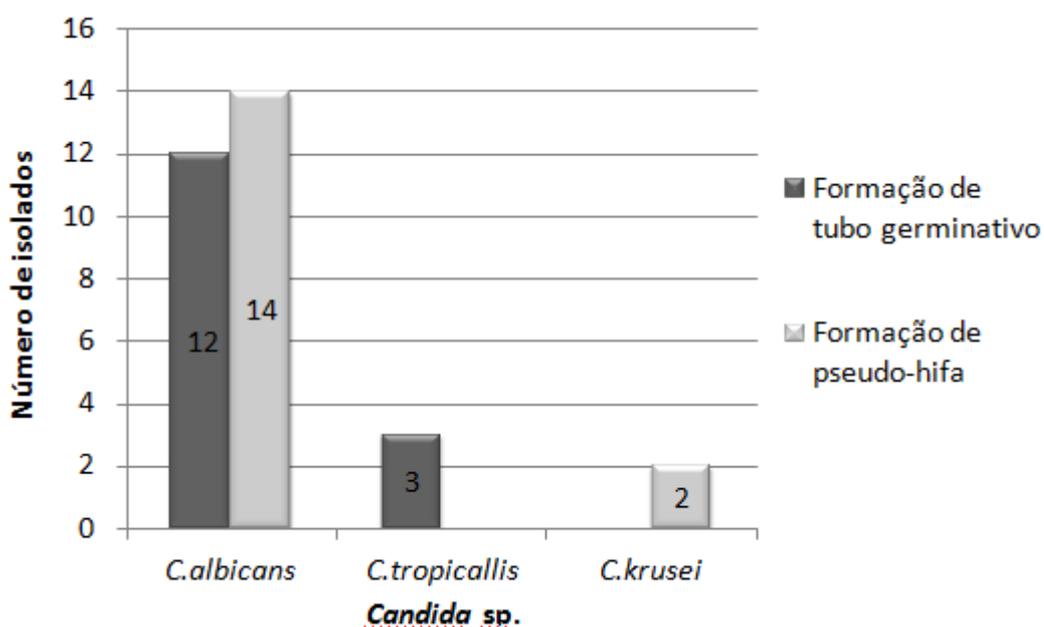


Figura 1. Número absoluto de isolados das espécies de *Candida spp.* que formaram tubo germinativo e pseudo-hifa.

Com relação aos resultados obtidos com a realização do experimento de formação de biofilme, classificamos os isolados de acordo com as categorias não-formador, fraco, médio e forte formador de biofilme, sendo que 10 (40%) foram de fraco-formadores, 10 (40%) de médio-formadores, 3 (12%) de forte-formadores e

2 (8%) de não-formadores, distribuídas percentualmente nas quatro espécies de *Candida sp.* Identificadas.

Deste modo, os resultados revelaram que a espécie *C.albicans* obteve quantidades iguais de fraco e médio-formadores (46,70%), 6,70% de forte-formadores e nenhum percentual de não-formadores. Já para a espécie *C. tropicalis*, os resultados apontaram 60% de fraco-formadores, quantidades iguais de médio e forte-formadores (20%) e nenhum percentual de não-formador. Enquanto que, para a espécie *C. glabrata*, foram obtidos 33,3% de forte-formadores, 66,7% de não-formadores e nenhum resultado para percentuais de fraco e médio-formadores. E, finalmente, para a espécie *C. Krusei* foram obtidos 100% de médio-formadores. (Figura 2).

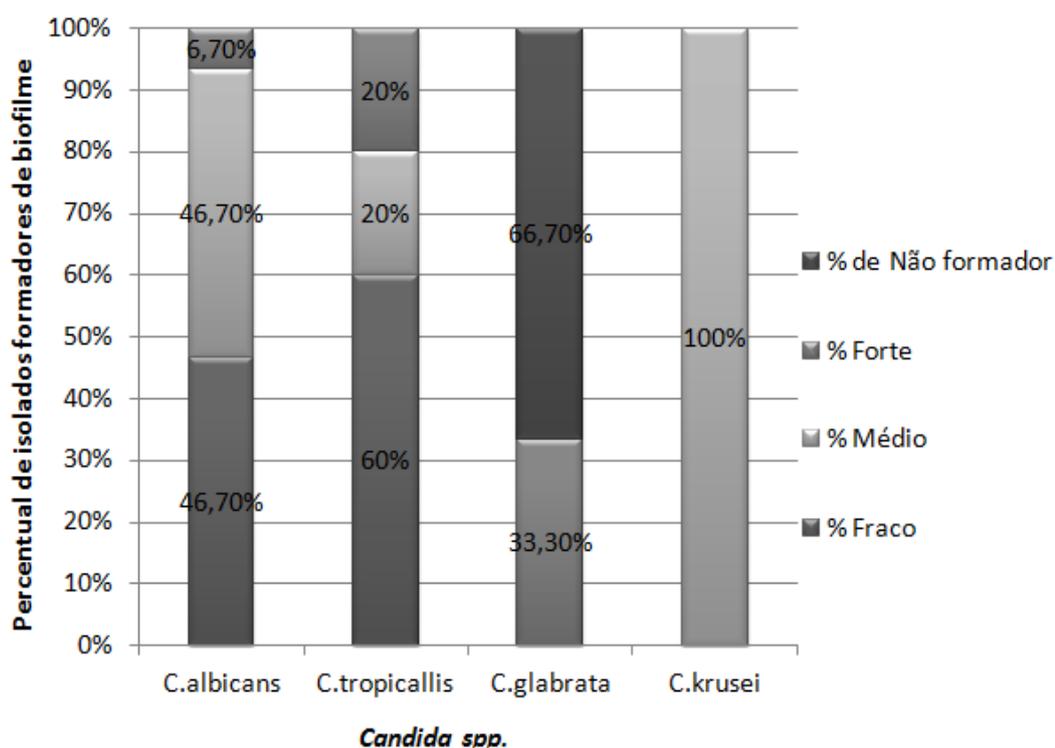


Figura 2. Percentual de isolados de *Candida spp.* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C.glabrata* e *C. Krusei*) formadores de biofilme, classificados segundo o critério: fraco, médio, forte e não-formador de biofilme.

Quanto ao número de isolados de *Candida spp.* formadores de pseudo-hifa e de biofilme e à intensidade de formação do biofilme, os mesmos foram agrupados de acordo com a Unidade Básica de Saúde (UBS) onde foram encontrados. Sendo 11 formadores de pseudo-hifa na Unidade Bananeiras, 7 na Unidade Vila dos Comerciantes, 3 na Unidade IAPI e 2 na Unidade Modelo. Dos formadores de biofilme, encontraram-se 6 fracos formadores, 6 médios formadores e um único forte formador no Centro Bananeiras, enquanto que no Centro Vila dos comerciantes encontraram-se 3 fracos formadores, 2 médios formadores e 2 não-formadores, já no Centro Modelo encontraram-se apenas fortes formadores (2) e, finalmente no Centro IAPI, encontraram-se 2 médios formadores e 1 fraco formador.

Para a análise da significância entre as variáveis estudadas, obtidas com os questionários das pacientes, para os isolados de *Candida spp.* formadores de tubo germinativo, pseudo-hifa e biofilme, as mesmas foram agrupadas em tabelas, separadamente, de acordo com cada um dos testes realizados e com a característica quantitativa (média de idade e número médio de parceiros sexuais) ou qualitativa (fumante, anticoncepcional, gravidez, diagnóstico e tipo de epitélio).

Realizou-se a análise das variáveis quantitativas, média de idade e número médio de parceiros sexuais, verificando-se, separadamente, se a média de idade e de parceiros sexuais das pacientes que formaram, respectivamente, tubo germinativo, pseudo-hifa e biofilme era significativamente diferente da média de idade e de parceiros sexuais das pacientes que não formaram tais estruturas patogênicas. Obteve-se, então, para a variável média de idade, com relação à formação de tubo germinativo um $p\text{-valor}=0,747$, quanto à formação de pseudo-

hifa obteve-se um p-valor=0,907 e à formação de biofilme, um p-valor=0,875. Já para a variável número médio de parceiros sexuais, com relação à formação de tubo germinativo um p-valor=0,906, quanto à formação de pseudo-hifa um p-valor=0,433 e à formação de biofilme, um p-valor=0,057 (Tabela 1).

Tabela 1. Análise da significância entre as variáveis quantitativas, média de idade e número médio de parceiros sexuais, estudadas para os resultados dos testes de formação de tubo germinativo, pseudo-hifa e biofilme.

	<u>Tubo-germinativo</u>			<u>Pseudo-hifa</u>			<u>Biofilme</u>		
	Formou	Não Formou	p-valor	Formou	Não Formou	p-valor	Formou	Não Formou	p-valor
Média de Idade	30,6	32,2	0,747	31,1	32	0,907	30,9	35	0,875
Média parceiros sexuais	9,9	7	0,906	9,6	4	0,433	9,3	1	0,057

Quanto à análise das variáveis qualitativas (fumante, anticoncepcional e gravidez) agruparam-se as pacientes, em separado, com relação à formação de tubo germinativo, pseudo-hifa e biofilme, de forma análoga ao procedimento com as variáveis quantitativas. Desse modo, analisou-se, separadamente, se a proporção das pacientes fumantes, das que fazem uso de anticoncepcional e das que já engravidaram e, que formaram as estruturas citadas nos testes acima, é significativamente diferente da proporção das pacientes que não são fumantes,

não fazem uso de anticoncepcional e que nunca engravidaram e que também formaram as estruturas citadas nos testes.

Obtiveram-se para os testes com relação às variáveis qualitativas, os seguintes resultados: para a variável fumante, com relação à formação de tubo-germinativo um p-valor=1, com relação à formação de pseudo-hifa, um p-valor=0,1892 e, quanto à formação de biofilme, um p-valor=0,4049. Enquanto que, para a variável anticoncepcional, com relação à formação de biofilme apresentou um p-valor=0,007385, à formação de pseudo-hifa, um p-valor=0,00149 e com relação à formação de biofilme, um p-valor=0,0004883. E, finalmente, para a variável gravidez, com relação à formação de tubo germinativo apresentou um p-valor=0,3018, com relação à formação de pseudo-hifa, um p-valor=0,1892 e quanto à formação de biofilme, um p-valor=0,057 (Tabela 2).

Tabela 2. Análise da significância entre as variáveis qualitativas, fumante, anticoncepcional e gravidez, estudadas somente para os resultados dos testes positivos de formação de tubo germinativo, pseudo-hifa e biofilme. Com 'sim' e 'não' representando a utilização e/ou alguma experiência na variável analisada.

	<u>Tubo-germinativo</u>			<u>Pseudo-hifa</u>			<u>Biofilme</u>		
	Sim	Não	p-valor	Sim	Não	p-valor	Sim	Não	p-valor
Fumante	47%	53%	1	33%	67%	0,1892	39%	61%	0,4049
Anticoncepcional	87%	13%	0,007385	86%	14%	0,00149	87%	13%	0,000488
Gravidez	67%	33%	0,3018	67%	33%	0,1892	70%	30%	0,09314

Dando continuidade às variáveis qualitativas, procedeu-se com a análise da variável diagnóstico da paciente com relação à coleta endo-cervical, agrupando-as como *dentro da normalidade* ou *inflamação*, correlacionando-as à formação de tubo germinativo, pseudo-hifa e biofilme, respectivamente. Desse modo, verificando se a proporção de pacientes que, diagnosticadas como dentro da normalidade e que formaram as três estruturas, era significativamente diferente da proporção de pacientes diagnosticadas com inflamação que formaram as estruturas, obtiveram-se os resultados: com relação à formação de tubo-germinativo obteve-se um p-valor=0,6072, com relação à formação de pseudo-hifa, um p-valor=0,6636 e quanto à formação de biofilme, um p-valor=0,4049 (Tabela 3).

Tabela 3. Análise da significância da variável diagnóstico das pacientes com relação à coleta endo-cervical, agrupando-as como *dentro da normalidade* ou *inflamação*, com relação somente aos resultados positivos de formação de tubo germinativo, pseudo-hifa e biofilme, respectivamente.

	<u>Tubo-germinativo</u>			<u>Pseudo-hifa</u>			<u>Biofilme</u>		
	Normal	Inflamado	p-valor	Normal	Inflamado	p-valor	Normal	Inflamado	p-valor
Diagnóstico Descritivo	9(60%)	6(40)%	0,607	12(57%)	9(43%)	0,6636	14(61%)	9(39%)	0,4049

Com relação à variável epitélio representativo das pacientes, foi possível classificá-los como escamoso e escamoso-glandular, cujo percentual encontrado com relação ao epitélio escamoso para a formação de tubo germinativo foi de

53% enquanto que para o escamoso-glandular foi de 47%, já para a formação de pseudo-hifa, o epitélio escamoso foi avaliado em 62%, enquanto que o escamoso-glandular ficou em 38%, e finalmente para a formação de biofilme, o epitélio escamoso apresentou percentual de 65% contra 35% do epitélio escamoso-glandular.

DISCUSSÃO

Fazendo-se uma avaliação dos resultados preliminares com relação aos isolados provenientes das coletas nas UBSs, utilizados em nossos testes, demonstrou-se uma prevalência de 18% de *Candida spp.* na mucosa vaginal, o que é considerada baixa, se comparada com a maioria dos dados literários cuja presença de candidíase vulvovaginal se apresenta em torno de 80%, como em estudo desenvolvido por Azzam-W *et al*⁽¹⁾, no qual foram avaliadas 200 pacientes, representando uma prevalência de 84,2%. Desse modo, com relação aos nossos isolados, os resultados assemelham-se mais com aqueles obtidos em estudo desenvolvido por Rosa e Rumel⁽²⁸⁾, no qual foram avaliados fatores de risco para candidíase vulvovaginal identificados em exudatos vaginais de 135 trabalhadoras de uma indústria de confecção em Criciúma (SC), em 2002, no qual obteve-se prevalência de candidíase vulvovaginal de 19,3%. De certo modo, o que pode ser explicado pelo fato de as amostras serem provenientes de ambulatórios ou serviços de demanda espontânea e não populacional.

Quanto à identificação das espécies de *Candida spp.*, os resultados obtidos com os isolados apresentam uma prevalência de *C. albicans*, representando 60% do total, o que se assemelha muito mais, de fato, com resultados de estudos sul-americanos^(9,27), do que o encontrado em estudos de outros países, que se remetem à percentuais muito mais elevados, variando entre 80 e 90% dos casos^(7,11,20,27). De acordo com Linhares *et al*⁽¹⁷⁾, foram identificadas *C. albicans* em 86,64% das pacientes que apresentavam corrimento, assim como Galle *et al*⁽¹⁰⁾, isolaram 74% de *C. albicans* de um total de 250 coletas de fluido vaginal para a realização de pesquisa direta e isolamento de leveduras através de exame de cultura.

Ainda com relação aos isolados, a avaliação percentual das espécies de *Candida não-albicans* utilizadas nos testes (*C. tropicalis* (20%), *C. glabrata* (12%) e *C. krusei* (8%)), demonstram concordância com estudos que apontam tais espécies emergentes como importantes responsáveis pelo desenvolvimento de candidíase vulvovaginal na última década^(9,11,20), sobretudo com relação às espécies *C. tropicalis* e *C. glabrata*^(9,28), confirmada neste estudo. O que pode ser atribuído à uma maior frequência na realização de testes laboratoriais de rotina, disponíveis atualmente, ou ser embasado no uso inadequado de antimicóticos^(10,28).

A análise dos resultados em termos de número absoluto de isolados que formaram tubo germinativo e pseudo-hifa, mostrou que, com isolados de *C. albicans*, cerca de 80%, formaram tubo germinativo e 93,3% formaram pseudo-hifa, confirmando dados literários que afirmam que cerca de 95% dos isolados, para *C. albicans*, produzem tubo germinativo e pseudo-hifa⁽²¹⁾, quando submetidos a testes laboratoriais de rotina, como os nossos, com ênfase para a

formação de tubo germinativo, formado principalmente por *C. albicans*, também confirmado em nosso estudo. Quanto às demais espécies de *Candida spp.*, nosso estudo confirmou o fato de a espécie *C. glabrata* não formar pseudo-hifa e também o fato de a análise da formação de tais estruturas ser bastante variável entre as espécies analisadas⁽¹⁶⁾.

Com relação ao teste de formação de Biofilme, este que é um dos mais importantes fatores de virulência para as espécies *Candida spp.*⁽⁵⁾, nossos resultados mostraram que todas as espécies estudadas, tanto *C. albicans* quanto *C. não-albicans* foram capazes de formar biofilme em superfície de poliestireno, nas condições analisadas, conforme relatado na literatura, embora em diferentes graus, dependendo da espécie e tensão^(26,29). Devido a essa graduação na intensidade de formação do biofilme, os mesmos foram então distribuídos nas diferentes categorias não-formador, fraco, médio e forte formador de biofilme, sendo que apenas a espécie *C. Krusei* apresentou homogeneidade nos resultados. Enquanto que as espécie *C. albicans* e *C. tropicalis* classificaram-se nas três categorias, fraco, médio e forte-formador, alternativamente à espécie *C. glabrata* que foi a que apresentou os dois únicos isolados não-formadores de biofilme, além de um forte formador, o que pode ser explicado em parte por uma diferença interespecie de biomassa e composição da matriz⁽³⁰⁾.

Cabe aqui comentar, ainda no que diz respeito à distribuição das espécies de *Candida spp.*, completamente variável, observada nos resultados dos testes de formação de tubo germinativo, pseudo-hifa e biofilme, com relação às unidades básicas de saúde das quais foram coletadas, que isso se deve a um critério que leva em conta apenas a localização geográfica, o que deve ser considerado pertencente aos fatores epidemiológicos⁽⁹⁾.

Com relação à análise da significância entre as variáveis quantitativas, média de idade e número médio de parceiros sexuais, estudadas para os testes de formação de tubo germinativo, pseudo-hifa e biofilme, provou-se que não há evidências estatísticas de que haja diferença significativa (nem quanto à média de idade, nem quanto ao número médio de parceiros sexuais) entre a média de idade das pacientes que formaram as estruturas e a média de idade das pacientes que não formaram as estruturas, assim como não há evidências estatísticas de que haja diferença significativa entre o número médio de parceiros sexuais das pacientes que formaram as estruturas em relação ao número médio de parceiros daquelas que não formaram.

Analogamente, com relação ao estudo da significância entre as variáveis qualitativas, fumante, uso de anticoncepcional e gravidez, com relação apenas à uso/vivência da variável e somente aos resultados positivos de formação de tubo germinativo, pseudo-hifa e biofilme, verificou-se que, com exceção da variável anticoncepcional, analisada para a formação das três estruturas, nenhuma das demais apresentou evidência estatística de diferença significativa entre o seu uso/vivência e a sua falta de uso/vivência com relação à formação das três estruturas testadas, respectivamente.

Logo, apenas para variável anticoncepcional, há evidências estatísticas significativas de que a proporção de pacientes que formam as estruturas (tubo germinativo, pseudo-hifa e biofilme) e que fazem uso desta variável é significativamente diferente da proporção de pacientes que também formam tais estruturas, apesar de não a usarem. Assim nossos resultados podem ser comparados com estudos que apontam a contracepção oral e terapia de reposição hormonal, com altas doses de estrogênio, como fatores de risco para o

desenvolvimento da candidíase vulvovaginal^(36,38). O que pode ser confirmado por Spacek et al⁽³²⁾ que relataram que os hormônios estrogênio e progesterona promovem aderência de *C. albicans* à mucosa, com conseqüente colonização vaginal.

Desse modo, procedeu-se com a avaliação das variáveis também qualitativas, epitélio representativo e diagnóstico descritivo, obtidas dos resultados de exames citológicos das pacientes, associando-as também à formação de tubo germinativo, pseudo-hifa e biofilme, cuja análise dos percentuais e significância, respectivamente, obtidos, não permite inferir que haja relação entre a formação de tais estruturas pelas cepas de *Candida spp.* que colonizam a mucosa vaginal e um diagnóstico de provável inflamação.

Assim sendo, o presente estudo constatou que aspectos predisponentes do hospedeiro e virulência dos agentes causais, ainda não estão totalmente esclarecidos com a nova distribuição etiológica da candidíase vulvovaginal. Embora todos os isolados de *Candida* terem expressado, ao menos, um dos três fatores de virulência estudados, o estudo apenas aponta o uso de anticoncepcional pelas pacientes como fator relacionado com o potencial de virulências das cepas.

REFERÊNCIAS

1. AZZAM, W.M. et al. Vulvovaginitis por *Candida spp.* y *Trichomonas vaginalis* en mujeres sexualmente activas. *Invest Clinic*, v. 43, n. 1, p.03-13, 2002.
2. CALDERONE, R.A.; FONZI, W. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*, v. 9, n.7, p. 327-50, 2001.

3. CANNON, R.D.; CHAFFIN, W.L. Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit Rev Oral Biol Med*; v.10, p. 359-383, 1999.
4. CORSELLO, S. *et al.* An epidemiological survey of vulvovaginal candidiasis in Italy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, v. 110, p. 66-72, 2003.
5. COSTERTON, J. W. *et al.* Microbial Biofilms. *Annual Review of Microbiology*, v.49, p. 711-745, 1995.
6. COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Robbins. Patologia estrutural e funcional. 6 ed. *Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan*, 2000.
7. DAN, M.; POCH, F.; LEVIN, D. High rate of vaginal infections caused by non-*C. albicans Candida* species among asymptomatic women. *Med Mycol*, v. 40, p.383-86, 2002.
8. DOUGLAS, L.J. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol*, v. 11, p. 30-36, 2003.
9. FERRAZA, M.H.S.H. *et al.* Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. *RBGO*, v. 27, n. 2, p. 58-63, 2005.
10. GALLE, L.C.; GIANNINI, M.J.S.M. Prevalência e susceptibilidade de leveduras vaginais. *J. Bras. Patol. Med. Lab*, v.40, p. 229-236, 2004.
11. GRIGORIOU, O. *et al.* Prevalence of clinical vaginal candidiasis in a university hospital and possible risk factors. *Eu. J. Obst. Gynecol. Reprod. Biol*, v. 126, p.121-125, 2006.
12. HASAN, F. *et al.* Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. *Microbes Infect*, v. 1, p. 753-76, 2009.
13. JABRA-RIZK, M. A. *et al.* Cell surface hydrophobicity-associated adherence of *Candida dubliniensis* to human buccal epithelial cells. *Rev Iberoam Micol* v.18, p. 17-22, 2001.
14. JR, P. L. F. Distinct Protective Host Defenses against oral and vaginal Candidiasis. *Med Mycol*, v. 40, n. 4, p. 359-375, 2002.
15. KUMAMOTO, C.A.; VINCES, M.D. Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. *Annu Rev Microbiol*, v. 59, p.113-133, 2005.
16. KURTZMAN, C.P.K.; FELL, J.W. The yeasts: a taxonomic study. *Amsterdam: Elsevier Science Publishers*, 1998.
17. LINHARES, L.M. *et al.* Differentiation between women with vulvovaginal symptoms who are positive or negative for *Candida* species by culture. *Infect Dis Obstet Gynecol.*, v. 9, p. 221-225, 2001.

18. LO, H. *et al.* Nonfilamentous *Candida albicans* mutants are avirulent. *Cell*, v. 90, p. 939-49, 1997.
19. MARRAZZO, J.M. Vulvovaginal candidiasis: over the counter doesn't seem to lead to resistance. *BMJ*, v. 326, p. 993-94, 2003.
20. MARTENS, M.G.; HOFFMAN, P.; EL-ZAATARI, M. Fungal species changes in the female genital tract. *J Low Genit Tract Dis*, v. 8, n.1, p. 21-4, 2004.
21. MORIS, D. V. *et al.* Oral *Candida* spp. colonization in human immunodeficiency virus-infected individuals. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*, v. 14, p. 224-257, 2008.
22. NARDIN, M.E. *et al.* Prevalencia de la candidiasis vulvovaginal y su relación con algunos factores de riesgo. *Rev Argent Microbiol*, 2000.
23. O'TOOLE, G.A.; KAPLAN, H.B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. *Ann Rev Microbiol*, v. 54, p. 49-79, 2000.
24. PATEL, D.A. *et al.* Risk factors for recurrent vulvovaginal candidiasis in women receiving maintenance antifungal therapy: results of a prospective cohort study. *Am J Obst Gyn*, v. 190, p. 644-53, 2004.
25. PICHOVÁ, I. *et al.* Secreted aspartic proteinases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*: inhibition with peptidomimetic inhibitors. *Eur J Biochem*, v. 268, p. 2669-77, 2001.
26. RAMAGE, G. V. *et al.* Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol*, v. 18, p.163-170, 2010.
27. RIVERO, M.; CENTENO, S.; DÍAZ, J. Frecuencia de especies de *Candida* aisladas en pacientes embarazadas con vulvovaginitis. *Rev Soc Venez Microbiol*, v 23, n.2, p.148-52, 2003.
28. ROSA, M.I.; RUMEL, D. Fatores associados à candidíase vulvovaginal: estudo exploratório. *Rev Bras Ginecol Obstet*, v. 26, n. 1, p. 65-70, 2004.
29. SHIN, J. H. *et al.* Biofilm Production by Isolates of *Candida* Species Recovered from Nonneutropenic Patients: Comparison of Bloodstream Isolates with Isolates from Other Sources. *J Clin Microbiol*, v.40, n.4, p.1244-1248, 2002.
30. SILVA, S. *et al.* Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Med Mycol*, v. 47, n.7, p. 681-689, 2009.
31. SOBEL, J.D. *et al.* Treatment of complicated *Candida* vaginitis: comparison of single and sequential doses of fluconazole. *Am J Obstet Gynecol*, v. 185, p. 363-9, 2001.

32. ŠPAČEK, J. *et al.* Clinical aspects and luteal phase assessment in patients with recurrent vulvovaginal candidiasis. *Europ J Obstet Gynecol Repr Biol*, v. 131, n.2, p.198-202, 2007.
33. STEPANOVIĆ, S. *et al.* Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, v.115, n. 8, p. 891-899, 2007.
34. SULLIVAN, D.; Coleman, D. *Candida dubliniensis*: Characteristics and Identification. *J Clin Microbiol*, v.36, n. 2, p. 329-334, 1998.
35. SULLIVAN, D. J. *et al.* *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiol*, v.141, n. 7, p.1507-1521,1995.
36. TARRY, W. *et al* *Candida Albicans*: The Estrogen Target for Vaginal Colonization. *J Surg Res*, v. 2, p. 278-282, 2005.
37. TEN CATE, J. M. *et al.* Molecular and Cellular Mechanisms That Lead to *Candida* Biofilm Formation. *J Den Res*, v. 88, p. 2, n. 105-115, 2009.
38. VAL, I.C.C.; ALMEIDA, G.L.F. Abordagem Atual da Candidíase Vulvovaginal. *DST. J. Bras. Doenças Sex. Transm*, v. 4, p.3-5, 2001.
39. VÁSQUEZ F. *et al* Actualización en infecciones de transmisión sexual: epidemiología, diagnóstico y tratamiento. *Doyma*, v. 22, p. 392- 411, 2004.
40. ZIARRUSTA, G.B. Vulvovaginitis candidiásica. *Rev Iberoam Micol*, v. 19, p. 22-4, 2002.

2. ANEXO

2. ANEXO

Regras para publicação no Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial (JBPML).

POLÍTICA EDITORIAL

O Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial (JBPML), uma continuação do Jornal Brasileiro de Patologia, que é publicado bimestralmente (fevereiro, abril, junho, agosto, outubro e dezembro), é um órgão oficial da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial (SBPC / ML), Sociedade Brasileira de Patologia (SBP) e Sociedade Brasileira de Citopatologia, indexados na Literatura Latino-Americana e do Caribe das Ciências da Saúde (LILACS), em Periódica e no Chemical Abstracts. É também membro do Scientific Electronic Library Online banco de dados (SCIELO). E que visa a publicação de trabalhos científicos que contribuam para o desenvolvimento da Medicina Laboratorial e aceita as seguintes categorias de texto: revisão, original, e artigos experimental; relatos de casos, comunicações breves e Etters para o editor. Os trabalhos poderão ser apresentados em português, inglês ou espanhol.

ANÁLISE DO MANUSCRITO

O manuscrito recebido será enviado a pelo menos dois avaliadores independentes, bem conhecidos pares científicos, com experiência na área discutida no artigo. Após a sua análise, o editor-chefe da JBPML entrará em contato com o autor principal para informar os passos a serem seguidos para a publicação ou a sua rejeição definitiva.

DIREITOS AUTORAIS

Os autores devem enviar um termo de responsabilidade declarando formalmente a autoria do texto e a transferência de direitos autorais. O sistema de gerenciamento de publicação de JBPML tem um modelo deste documento e as instruções para preenchê-lo e enviá-lo.

ÉTICA

Estudos realizados com seres humanos, incluindo órgãos e / ou tecidos isolados, bem como registros clínicos, devem estar de acordo com os padrões 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (<http://www.bioetica.ufrgs.br/res19696.htm>). Trabalhos a serem publicados devem estar acompanhados do certificado do comitê de ética da instituição onde a pesquisa foi realizada, de acordo com a Declaração de Helsinki, 1989 (<http://www.bioetica.ufrgs.br/helsin4.htm>). Nas investigações experimentais envolvendo animais, os princípios éticos da experimentação animal declarado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e os padrões estabelecidos pelo Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório (Institute of Laboratory Animal Resources, Comissão de Life Sciences, National Research Council , Washington, DC, 1996) devem ser respeitados.

As drogas e substâncias químicas utilizadas na pesquisa devem ser identificadas com precisão. Nomes ou iniciais do paciente, nomes comerciais, empresas e registros hospitalares não devem ser utilizados.

RESUMO E PALAVRAS-CHAVE

Independentemente da língua em que o artigo foi escrito, deve haver dois resumos: um em Português e outra em Inglês. Os resumos devem identificar os objetivos, procedimentos e conclusões da pesquisa (máximo de 250 palavras para revisão, originais e artigos de atualização, e máximo de 100 palavras para relatórios de casos e comunicações breves). Se o artigo está em espanhol, também deve haver um resumo em espanhol. As palavras-chave, que representam o assunto discutido no artigo, devem estar dentro de 3-6, usando vocabulário controlado Descritores das Ciências da Saúde (DeCS) da BIREME, com outros termos, quando necessário. Eles devem ser apresentados em Português e Inglês. Se o artigo for escrito em espanhol, as palavras-chave também devem estar nessa língua.

AGRADECIMENTOS

Eles devem ser breves, diretos e dirigidos à pessoa ou instituição que contribuiu consideravelmente para a elaboração da pesquisa. Devem ser incluídos após a conclusão e antes das referências bibliográficas.

ESTRUTURA DO TEXTO

ARTIGOS ORIGINAIS

Destinam-se a relatar a resultados de pesquisa original inédita, que pode ser replicado e generalizado. Os artigos podem ter um máximo de 4.000 palavras. A estrutura formal deve seguir a estrutura de apresentação deste tipo de artigo: Introdução, Objetivos, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões e Referências. O uso de subtítulos é recomendado, particularmente em

Discussão. Implicações clínicas e limitações do estudo devem ser claramente indicadas. O tópico Material e Método deve ser bem detalhado. Nesses artigos, a apresentação de um resumo estruturado em português e inglês é necessário com a apresentação formal do artigo: Introdução, Objetivos, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões e Referências. O resumo em Inglês deve ser precedido pelo título em Inglês. As referências devem ser no final do texto de acordo com as seguintes normas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências bibliográficas devem aparecer no final do artigo, em ordem alfabética numerada. Eles devem seguir as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) - NBR-6023 (agosto 2000). Os títulos de periódicos devem ser referidos na forma abreviada de acordo com o Index Medicus (List of Journals Indexed in Index Medicus). Se as referências não seguirem os padrões adotados, os artigos serão imediatamente rejeitados, sem revisão de conteúdo.

Os autores devem se certificar de que as referências citadas no texto estão incluídos na bibliografia com datas exatas e nomes de autores com precisão por escrito. A precisão da bibliografia é de responsabilidade dos autores. Comunicações pessoais, original ou em textos andamento poderão ser citados quando absolutamente necessário, mas não podem ser incluídos nas referências, apenas mencionados no texto ou em notas de rodapé. As referências devem seguir os exemplos abaixo. Para consulta e exemplos, consultar o site <http://www.scielo.br/revistas/jbpml/iinstruc.htm#001>.

TABELAS

As tabelas devem ser numeradas consecutivamente em algarismos arábicos e acompanhadas de um título. Os mesmos dados não devem ser repetidos. As tabelas devem seguir as normas de apresentação tabular estabelecidas pelo Conselho Nacional de Estatística e publicado pela Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 1993). As ilustrações (gráficos, fotos, desenhos, etc) devem ser numeradas consecutivamente em números arábicos e citados como figuras. Eles devem ser suficientemente claros para permitirem a reprodução. Os gráficos devem ser preparados em um sistema de processamento gráfico. Os locais aproximados onde as ilustrações serão intercaladas como figuras no texto devem ser indicadas. Aceitamos tabelas, imagens e gráficos nos seguintes formatos de arquivo eletrônico: jpg, gif, psd, tif e png.

ABREVIATURAS E NOMES DA MEDICINA

Usar o nome genérico dos medicamentos e indicar a fonte de substâncias não disponíveis para prescrição. As abreviações devem ser indicadas no texto. As unidades de medida, assim como abreviaturas devem ser expressas no sistema métrico decimal e, se for desejo do autor, na Internacional entre parênteses.

CONTATO COM JBPML

Sociedade Brasileira de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial

Tel:(21)3077-1400

e-mail: jbpml@sbpc.org.b

