

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – *CAMPUS*
DE FRANCISCO BELTRÃO, CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE,
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE – NÍVEL MESTRADO

RENATIELI BIANCATTI

**Fatores de virulência e o perfil de sensibilidade aos antifúngicos
de isolados clínicos de *Candida albicans* de pacientes
soropositivos e soronegativos para HIV: estudo experimental *in*
*vitro***

FRANCISCO BELTRÃO – PR
(SETEMBRO/2025)

RENATIELI BIANCATTI

Fatores de virulência e o perfil de sensibilidade aos antifúngicos de isolados clínicos de *Candida albicans* de pacientes soropositivos e soronegativos para HIV: estudo experimental *in vitro*

DISSERTAÇÃO apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Aplicadas à Saúde, nível Mestrado, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientador(a): Dra. Cleide Viviane Buzanello

Co-orientador(a): Dr. Ronan de Farias Freire

FRANCISCO BELTRÃO – PR
(SETEMBRO/2025)

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Biancatti, Renatieli

Fatores de virulência e o perfil de sensibilidade aos antifúngicos de isolados clínicos de Candida albicans de pacientes soropositivos e soronegativos para HIV: estudo experimental in vitro / Renatieli Biancatti; orientadora Cleide Viviane Buzanello; coorientadora Ronan Farias Freire de Souza . -- Francisco Beltrão, 2025.

36 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Francisco Beltrão) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde, 2025.

1. Candida albicans. 2. Fatores de virulência. 3. HIV. I. Buzanello, Cleide Viviane , orient. II. Freire de Souza , Ronan Farias, coorient. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

RENATIELI BIANCATTI

Fatores de virulência e o perfil de sensibilidade aos antifúngicos de isolados clínicos de *Candida albicans* de pacientes soropositivos e soronegativos para HIV: estudo experimental *in vitro*

Essa dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e pela Banca Examinadora.

BANCA EXAMINADORA

Orientador (a): Profa. Dra. Cleide Viviane Buzanello
UNIOESTE

Membro da banca: Prof. Dr. Volmir Pitt Benedetti
UNIPAR

Membro da banca: Profa. Dra. Márcia Rosângela Buzanello
UNIOESTE

FRANCISCO BELTRÃO, PR
SETEMBRO/2025

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, saúde e perseverança para concluir a pesquisa, sem minha fé, nada disso seria possível. Ao meu companheiro Vinicyus Moraes, o qual estive ao meu lado nos momentos mais difíceis, me auxiliando tanto na confecção gráfica da dissertação e artigo quanto nas atividades laboratoriais. A minha família (Adão Biancatti pai, Marinez Biancatti mãe, Rafael Ricardo e Renato Cezar irmãos) pelo apoio de sempre. Aos acadêmicos Ricardo Cordeiro Batista, Eduarda Cooper e Gustavo Morita, pelo auxílio no laboratório através dos programas de iniciação científica pela graduação de Medicina da Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Ao meu coorientador Dr. Ronan Faria Freire de Souza, por ter aceitado e auxiliado durante a pesquisa, a Letícia pelo auxílio laboratorial em um feriado prolongado, a Mayara Rossi, na época técnica do laboratório de microbiologia, por todo apoio e auxílio nas atividades laboratoriais, a Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) pela oportunidade em realizar a pesquisa, mantendo as portas abertas sempre que precisei e por fim e não menos importante, agradeço a minha orientadora Dra. Cleide Viviane Buzanello, a qual tenho orgulho de dizer que é minha orientadora. Ela que me aceitou desde o princípio, mesmo sabendo de todo o trabalho que teria, afinal, uma odontóloga focada em atendimento clínico, seguir com atividades laboratoriais de pesquisa, seria iniciar do 0 (zero), como sempre relatei “não lembrava a nomenclatura das vidrarias para uso laboratorial”.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus e em sequência a minha Avó materna Maria Eugenia Pereira da Silva (in memória) a qual sempre me incentivou

Fatores de virulência e o perfil de sensibilidade aos antifúngicos de isolados clínicos de *Candida albicans* de pacientes soropositivos e soronegativos para HIV: estudo experimental *in vitro*

Resumo

As infecções fúngicas, especialmente o gênero *Candida* tornaram-se uma preocupação global devido ao aumento da virulência e à resistência antifúngica. Fatores como avanço médico, maior expectativa de vida, uso excessivo de antimicrobianos e mudanças climáticas contribuem para a sua expansão, destacando a importância de identificar fatores de virulência para um diagnóstico precoce e tratamento eficaz. Esse trabalho teve por objetivo analisar fatores de virulência e o perfil de sensibilidade aos antifúngicos de isolados clínicos de *Candida albicans* de pacientes soropositivos e soronegativos para HIV, a fim de identificar possíveis diferenças na resistência e na capacidade de invasão fúngica entre os grupos. As amostras de *Candida albicans* provenientes de pacientes soropositivo e soronegativos para HIV foram submetidas à subcultura em Batata Dextrose Ágar (BDA) a 35°C durante 24 horas anteriormente aos testes. Após o crescimento, as culturas foram ajustadas à concentração de 1×10^6 UFC/mL e inoculados em placas de Petri contendo os meios de cultura indicados para cada teste. Foram analisados os fatores de virulência relacionados à termotolerância, morfogênese, produção de fosfolipases e proteinases, formação de tubo germinativo e produção de biofilme. Além disso o perfil de sensibilidade aos antifúngicos anfotericina B (AnfB) e fluconazol foi avaliado por meio da técnica de microdiluição em caldo, seguindo os protocolos padronizados. Como resultado, após as devidas análises laboratoriais dos testes *in vitro*, pode-se verificar que não houve diferença estatística significativa nos fatores de virulência expressados pela *Candida albicans* entre os diferentes grupos incluídos no estudo, toda via, ao se comparar a cepa controle ATCC, para formação de biofilme, houve diferença estatística significativa. Após ser traçado o perfil de sensibilidade aos fármacos fluconazol e anfotericina B, constatou-se que as amostras apresentaram um CIM mais elevado para fluconazol, o que diferiu ao se avaliar anfotericina B, o qual apresentou CIM em menores concentrações do fármaco. Pode-se concluir uma diversidade de fatores com potencial patogênico expressados pela *Candida albicans*, destacando a importância da compreensão dos mecanismos relacionados à patogenicidade e a resistência antifúngica. Estudos futuros são necessários, com intuito de avaliar outras formas de virulência, e outros fármacos antifúngicos.

Palavras-chaves: levedura oral, resistência antifúngica, candidíase associada à soropositivo para HIV.

Virulence factors and antifungal susceptibility profile of *Candida albicans* clinical isolates from HIV-seropositive and -seronegative patients: an in vitro experimental study.

Abstract

Fungal infections, especially those of the *Candida* genus, have become a global concern due to increasing virulence and antifungal resistance. Factors such as medical advancements, longer life expectancy, overuse of antimicrobials, and climate change contribute to their expansion, highlighting the importance of identifying virulence factors for early diagnosis and effective treatment. This work aimed to analyze virulence factors and the antifungal susceptibility profile of clinical isolates of *Candida albicans* from HIV-seropositive and -seronegative patients, in order to identify possible differences in resistance and fungal invasiveness between the groups. *Candida albicans* samples from HIV-seropositive and -seronegative patients were subcultured on Potato Dextrose Agar (PDA) at 35°C for 24 hours prior to testing. After growth, the cultures were adjusted to a concentration of 1×10^6 CFU/mL and inoculated into Petri dishes containing the culture media indicated for each test. Virulence factors related to thermotolerance, morphogenesis, phospholipase and proteinase production, germ tube formation, and biofilm production were analyzed. Furthermore, the sensitivity profile to the antifungals amphotericin B (AnfB) and fluconazole was evaluated using the broth microdilution technique, following standardized protocols. After appropriate laboratory analyses of the in vitro tests, it was possible to verify that there was no statistically significant difference in the virulence factors expressed by *Candida albicans* between the different groups included in the study. However, when compared to the ATCC control strain, there was a statistically significant difference in biofilm formation. After profiling the sensitivity of fluconazole and amphotericin B, it was found that the samples presented a higher MIC for fluconazole, which differed when evaluating amphotericin B, which presented MIC at lower concentrations of the drug. It can be concluded a diversity of factors with pathogenic potential expressed by *Candida albicans* can be observed, highlighting the importance of understanding the mechanisms related to pathogenicity and antifungal resistance. Future studies are needed to evaluate other

forms of virulence and other antifungal drugs.

Keywords: oral yeast, antifungal resistance, HIV-associated candidiasis

ARTIGO CIENTÍFICO 01

Fatores de virulência e o perfil de sensibilidade aos antifúngicos de isolados clínicos de *Candida albicans* de pacientes soropositivos e soronegativos para HIV: estudo experimental *in vitro*

Renatieli biancatti ¹ - ORCID <https://orcid.org/0009-0006-9587-5206>

Ricardo Cordeiro Batista ² - ORCID <https://orcid.org/0000-0002-0618-3149>

Eduarda Cooper ² - ORCID <https://orcid.org/0009-0009-8476-7842>

Gustavo Yochiak Morita ² ORCID <https://orcid.org/0009-0000-1440-6691>

Ronan Faria Freire de Souza ³ ORCID <https://orcid.org/0000-0001-9838-5372>

Volmir Pitt Benedetti ⁴ – ORCID <https://orcid.org/0000-0002-43806026>

Susana Johann ⁵ – ORCID <https://orcid.org/0000-0001-8068-1720>

Lirane Elize Defante Ferreto ⁶ ORCID <https://orcid.org/0000-0002-0757-3659>

Cleide Viviane Buzanello ⁷ ORCID <https://orcid.org/0000-0003-0353-4721>

¹Mestranda em Ciências Aplicadas à Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, campus Francisco Beltrão, PR

²Acadêmico de Medicina, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, campus Francisco Beltrão, PR

³Pós-doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, campus Francisco Beltrão, PR

⁴Professor do departamento de Farmácia, Universidade Paranaense, campus Francisco Beltrão, PR

⁵Professora associada na Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG

⁶Professora do programa de pós-graduação em ciências aplicadas à Saúde e coordenadora do Laboratório biociências e saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Francisco Beltrão- PR

⁷Professora Programa de Pós-Graduação Ciências Aplicadas a Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, campus Toledo, PR

*Correspondente: rebiancatti11@gmail.com

Resumo

Introdução: As infecções fúngicas, especialmente o gênero *Candida* tornaram-se uma preocupação global devido ao aumento da virulência e à resistência antifúngica. Fatores como avanço médico, maior expectativa de vida, uso excessivo de antimicrobianos e mudanças climáticas contribuem para a sua expansão, destacando a importância de identificar fatores de virulência para um diagnóstico precoce e tratamento eficaz. **Objetivo:** Analise dos fatores de virulência e o perfil de sensibilidade aos antifúngicos de isolados clínicos de *Candida albicans* de pacientes soropositivos e soronegativos para HIV, a fim de identificar possíveis diferenças na resistência e na capacidade de invasão fúngica entre os grupos. **Metodologia:** Amostras de *Candida albicans* provenientes de pacientes soropositivo e soronegativos para HIV foram submetidas à subcultura em Batata Dextrose Ágar (BDA) a 35°C durante 24 horas anteriormente aos testes. Após o crescimento, as culturas foram ajustadas à concentração de 1×10^6 UFC/mL e inoculados em placas de Petri contendo os meios de cultura indicados para cada teste. Foram analisados os fatores de virulência relacionados à termotolerância, morfogênese, produção de fosfolipases e proteinases, formação de tubo germinativo e produção de biofilme. Além disso, o perfil de sensibilidade aos antifúngicos anfotericina B (AnfB) e fluconazol foi avaliado por meio da técnica de microdiluição em caldo, seguindo os protocolos padronizados. **Resultados:** Termotolerância, houve crescimento de 100% das amostras nas cinco temperaturas distintas. Esses resultados evidenciam a diversidade na expressão dos fatores de virulência em *Candida albicans*, destacando a importância de compreender os mecanismos relacionados à patogenicidade e resistência antifúngica. **Conclusão:** Verificou-se a necessidade de mais estudos voltados aos fatores de virulência de *candida albicans*.

Declaração de impacto

Candida albicans, caracteriza-se por ser um microorganismo do reino fungi, presente em todos os ambientes. No organismo humano é considerado um comensal, pois vive normalmente sem causar injúrias, até que ocorra a quebra da barreira imunológica e assim possa atuar como patógeno. Devido ao progresso da medicina, ao uso indiscriminado de antimicrobianos e aumento da temperatura global, este microorganismo, sofreu mudanças que acarretaram propriedades antifúngicas de resistência aos fármacos, através da expressão de fatores de virulência. Com isso, o presente trabalho teve como objetivo, analisar *in vitro* os fatores de virulência expressados pela *Candida albicans* entre os diferentes grupos de isolados clínicos. Também se analisou o perfil de sensibilidade aos fármacos anfotericina B e fluconazol. Esse trabalho foi de grande relevância científica, devido à ausência de trabalhos relacionando aos fatores de virulência expressados pela *Candida* em pacientes HIV+ e com amostras de isolados clínicos acometidos por outras patologias que não HIV. Como hipótese de resultado, o esperado eram maiores valores para os isolados pertencentes aos portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV). Como limitações, pode-se inferir um número pequeno de amostras analisadas.

Palavras-chaves: levedura oral, resistência antifúngica, candidíase associada à soropositivo para HIV.

Introdução

A crescente carga global por infecções fúngicas representa uma importante crise à saúde global. Pois, estas alterações profundas e sistêmicas estão intimamente ligadas ao aparecimento em ambientes de assistência à saúde, sendo a *Candida* spp. responsável por 90% das infecções invasivas estando ligada também ao aumento de indivíduos imunocomprometidos ¹.

Candida albicans é conhecida por ser uma das espécies fúngicas que causam doenças nos seres humanos, sendo membro da microbiota natural do organismo que coloniza de forma assintomática o trato gastrointestinal, reprodutivo, cavidade oral e pele da maioria dos seres humanos ². Em sistemas imunológicos saudáveis, o fungo é geralmente inofensivo, estando em equilíbrio com as demais microbiotas. No entanto, oscilações dessas microbiotas podem propiciar à essa espécie fúngica, condições favoráveis para que ela invada o sistema imunológico e se torne patogênica ³.

Essas condições também têm sido associadas a pacientes portadores de doenças crônicas não transmissíveis, como asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e diabetes, bem como a outras infecções, como tuberculose, gripe e coronavírus ⁴.

Recentemente taxas de infecção fúngica na população soropositivo para HIV tem crescido devido aos avanços em procedimentos médicos e tecnologias como transplante de órgãos sólidos, radiações e quimioterapias.

Em indivíduos soropositivos para HIV, os fungos têm a capacidade de driblar de forma eficiente o sistema imunológico e os mecanismos de defesa do hospedeiro, garantindo assim a instalação e progressão da infecção.

Diante da problemática do constante crescimento das infecções fúngicas, tem emergido simultaneamente a resistência antifúngica ⁵, visto que os fungos apresentam estrutura celular eucariótica, os antimicrobianos disponíveis no mercado são limitados devido ao seu alvo na estrutura celular, sendo descritas resistência clínica ou micológica. A resistência clínica é considerada quando há falha em eliminar uma infecção fúngica de um paciente, já a resistência micológica, se considera quando o fungo tem a capacidade de se proliferar na presença de antifúngicos administrados na forma *in vitro* ⁶.

Os fatores que contribuem para o surgimento e o aumento da resistência

antifúngica estão relacionados principalmente ao uso frequente e prolongado de antifúngicos de forma profilática. Além disso, a resistência pode ser atribuída ao desenvolvimento de mecanismos adaptativos aos antimicrobianos, incluindo a alteração ou superexpressão do alvo da droga, a regulação positiva de transportadores de múltiplas drogas e a ativação de respostas ao estresse ⁷.

Outro fator de resistência está relacionado ao potencial de produção de biofilme, no qual a *Candida albicans* é capaz de formar uma matriz extracelular que permite a chegada de nutrientes essenciais para seu crescimento, estabelecendo, assim, uma comunidade altamente robusta e resistente às drogas antifúngicas ⁸.

Resultados

Análise estatística

Todos os resultados foram tabelados em software Microsoft Excel 365, posteriormente foi realizado o tratamento estatístico, utilizando teste Fisher Exact Test, Kruska-wallis, Chi-Square Test, Shapiro-Wilk Test, Teste T e Holm's Method para alguns fatores.

Termotolerância

Decorrido o período de incubação das amostras, as placas foram abertas em fluxo laminar e observou-se o crescimento das colônias, as quais tiveram crescimento de 100% em todas as temperaturas testadas em 48 horas, como pode se observar pela figura 01.

Figura 01

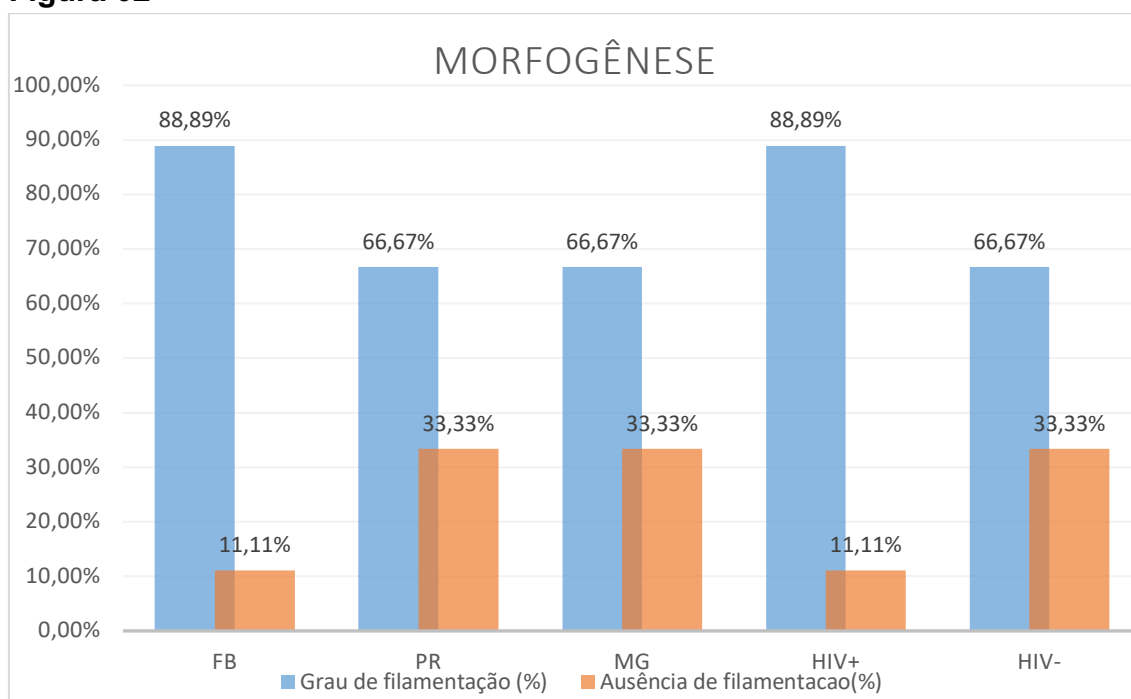


* Figura 01 - Análise visual do crescimento de colônias após o período de incubação 48 horas a 35°C.

Morfogênese

Para leitura do fator, foi observado de forma visual o grau de filamentação de cada amostra, após decorrido o tempo de incubação, sendo os resultados classificados conforme a metodologia de Calera *et al.*, 2000. Como resultado, por grupo localidade em percentuais, Francisco Beltrão apresentou 88,89%, Curitiba e Minas Gerais 66,67% com algum grau de filamentação. Para os grupos HIV e não HIV os resultados foram de 88,89 e 66,67% respectivamente, conforme apresentado na figura 02, não havendo diferença estatística significativa após tratamento pelo teste Fisher Exact Test.

Figura 02



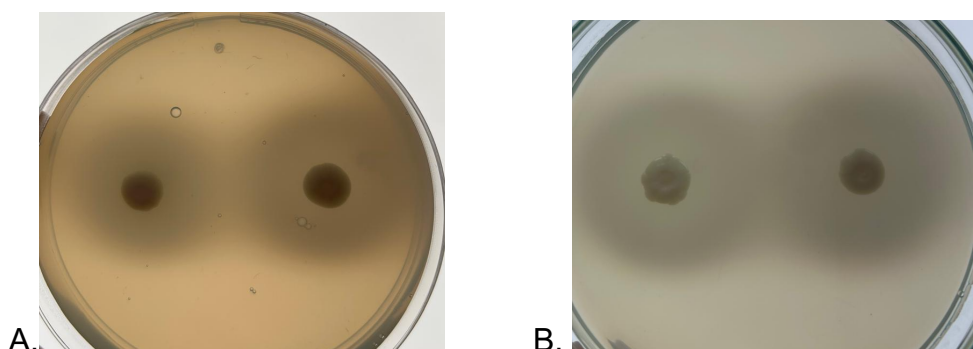
*Figura 02 - Gráfico representando os percentuais para atividade de morfogênese em cada grupo de isolado. Francisco Beltrão (FB), Curitiba (PR), Belo Horizonte (MG), HIV+ (isolados positivo para HIV) e HIV- (isolados negativos para HIV). Coluna em azul indicando presença de algum grau de filamentação, coluna vermelha indicando ausência de filamentação.

Ao se analisar os graus de filamentação dentro de cada grupo, em ausência (-), média (++) e alto grau de filamentação (+++), tivemos em percentuais, FB com 11,11% ausência, 72,22% média e 16,66% com alto grau de filamentação. Já no grupo MG e PR, 66,66% com média filamentação e 33,33% ausência de filamentação, nestes grupos não se observou alto grau de filamentação.

Atividade enzimática extracelular de Proteinases

Após o período de incubação, as amostras foram analisadas de forma visual conforme a figura 03, onde o halo de clarificação ao redor da colônia formada foi medido em milímetros, com objetivo de calcular o valor de Pz.

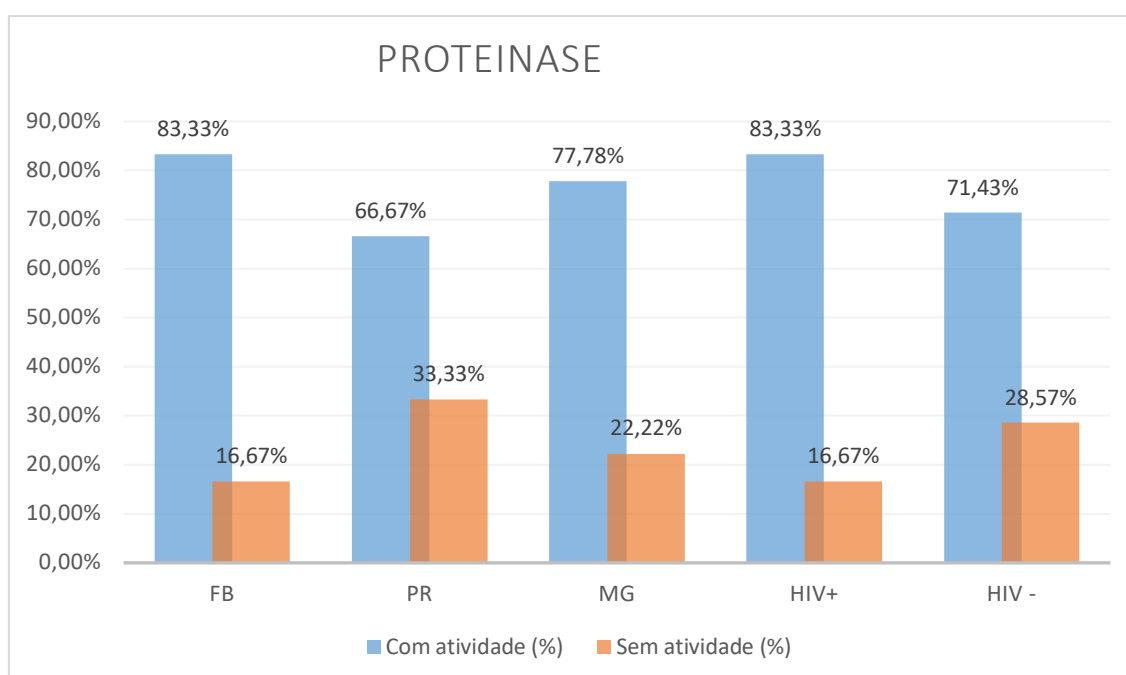
Figura 03



*Figura 03 - A e B, análise visual da atividade extracelular enzimática de Proteinases. Observando-se o halo de clarificação ao redor da colônia crescida.

Os resultados passaram por tratamento estatístico de média, desvio padrão e teste Kruska-wallis, pelo programa Microsoft excel 365, no intuito de avaliar diferenças estatísticas entre os grupos de Francisco Beltrão- Pr, Curitiba- Pr e Belo Horizonte- MG. Em um segundo momento avaliou-se com a mesma metodologia estatística a diferença entre os grupos de amostras portadores de HIV e não HIV onde ambos estão representados pela figura 04.

Figura 04



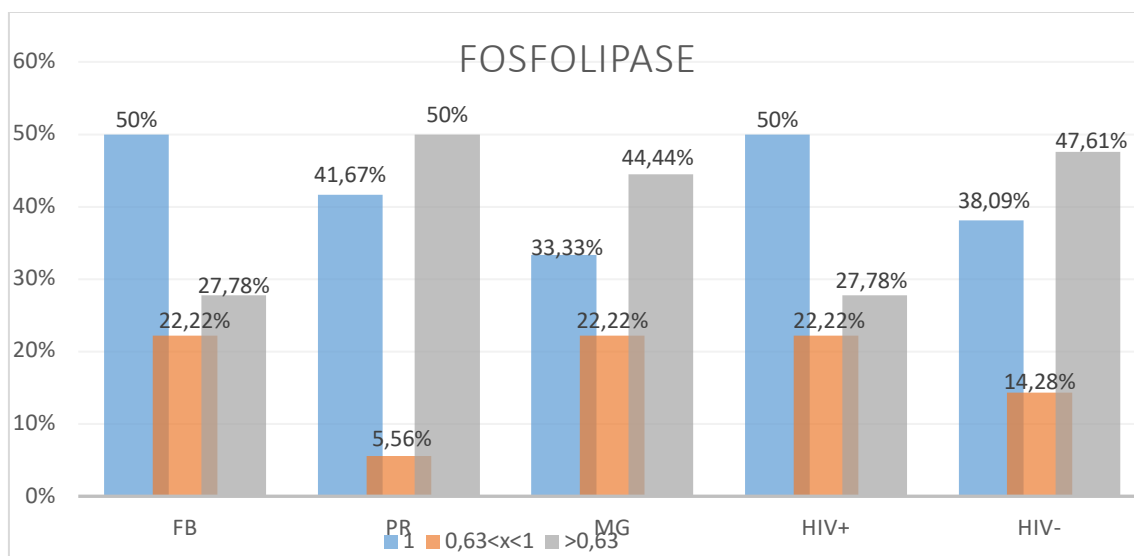
*Figura 04 - Gráfico representando os valores percentuais de atividade enzimática para os diferentes grupos. FB=Francisco Beltrão, PR= Curitiba, MG= Minas Gerais, HIV+= vírus da imunodeficiência adquirida, HIV- = vírus da imunodeficiência adquirida.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, visto que as análises, tiveram um valor $p > 0,05$ indicando que não houve diferença entre os três grupos.

Atividade enzimática extracelular de fosfolipase

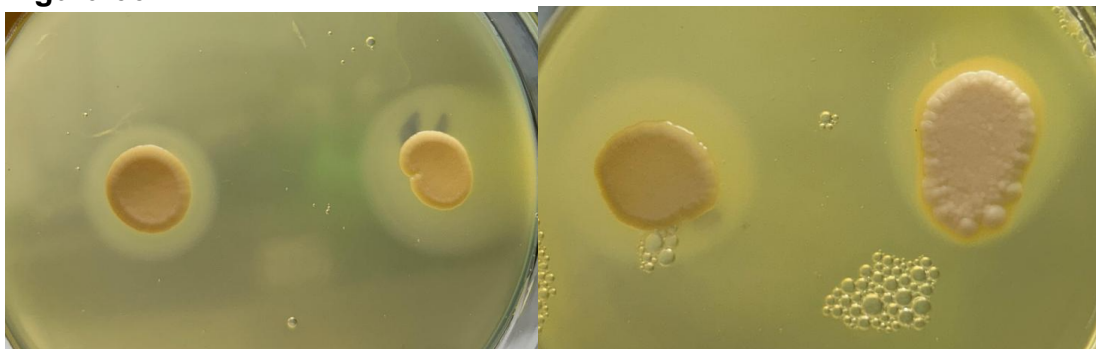
Para este fator de virulência, após o período de incubação, as amostras foram analisadas de forma visual conforme figura 06. O valor Pz foi calculado através da fórmula $\frac{DC}{DC+DH}$, onde se obteve a razão entre o diâmetro da colônia formada e o halo ao redor da colônia. Com estes resultados, obteve-se os percentuais para cada grupo, conforme figura 05.

Figura 05



*Figura 05 - FB=Francisco Beltrão, PR= Curitiba, MG= Minas Gerais, HIV+= vírus da imunodeficiência adquirida, HIV- = vírus da imunodeficiência adquirida -. Os valores acima demonstram o valor de Pz, tendo como valor de referência 0,63, indicando atividade enzimática de fosfolipase por isolados de *Candida albicans* nos diferentes grupos. Valor = 1,00 indicando atividade negativa para a enzima, valor entre 0,9-0,63 atividade enzimática positiva e valor = ou > que 0,63 atividade enzimática fortemente positiva para fosfolipases.

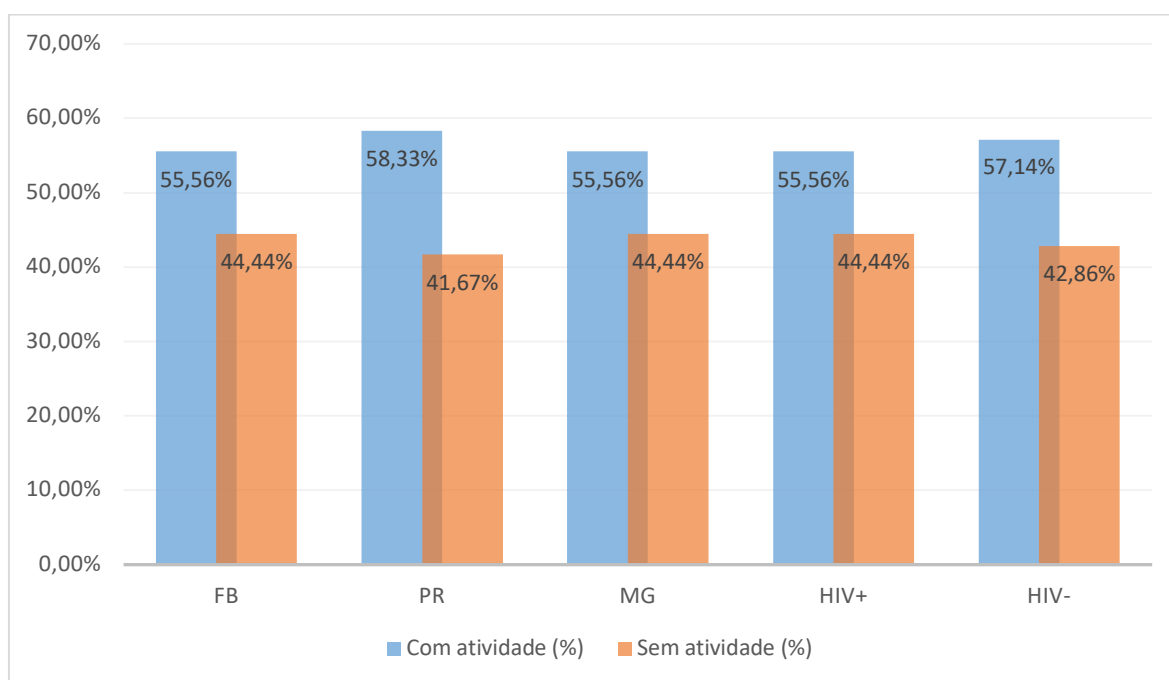
Para análise estatística seguiu-se com o teste kruska-wallis, onde pode-se verificar que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, com valor de $p > 0,05$.

Figura 06

*Figura 06 - Colônias crescidas e visualização da atividade enzimática de fosfolipase através da formação de halo ao redor da colônia

Formação de tudo germinativo

Decorrido o tempo de incubação e após a preparação das amostras, com corante violeta geniana, para visualização em microscópio óptico (40x10), se observou que entre as amostras por localidade, Francisco Beltrão apresentou em percentuais, 55,56 das amostras, formação de tudo germinativo, Curitiba com 58,33 e Minas Gerais com 55,56. No quesito grupo HIV, 55,56% apresentaram formação de tubo germinativo seguido do grupo não HIV com 57,14% conforme ilustrado no gráfico 07.

Gráfico 07

*Figura 07 – Gráfico apresenta os resultados em percentual para produção de tubo germinativo. Francisco Beltrão (FB), Curitiba (PR), Belo Horizonte (MG), HIV+ (isolados oriundos de pacientes soro positivo para HIV) e HIV- (isolados clínicos oriundos de pacientes não portadores de HIV).

Após tratamento estatístico, através do teste Chi-Square Test, se conclui que a frequência de formação do tubo germinativo é igual entre as regiões, portanto sem haver diferença estatística significativa.

Perfil de sensibilidade aos antifúngicos fluconazol e anfotericina B

Para avaliar o perfil de sensibilidade de cada isolado frente aos fármacos, fluconazol e anfotericina B, após análise de 48 horas, as placas foram avaliadas de forma visual, onde verificou-se qual a menor concentração inibitória do fármaco testado capaz de inibir 100% o crescimento do fungo, anfotericina B testada na concentração de 8-0,03ug/ml e fluconazol em 64-0,156ug/ml. Como valores de CIM para cada amostra, segue tabela 01. Ao se tabelar os resultados, optou-se por inserir um CIM no dobro da maior concentração do fármaco, indicando que as amostras obtiveram crescimento em todas as concentrações da droga antifúngica testada.

Tabela 01

AMOSTRAS	FLUCONAZOL 48 HORAS	ANFOTERICINA B 48 HORAS
FB01	2ug/ml	8ug/ml
FB02	128ug/ml	2ug/ml
FB04	128ug/ml	0,0156ug/ml
FB08	128ug/ml	4ug/ml
FB36	128ug/ml	4ug/ml
FB37	128ug/ml	8ug/ml
FB39	8ug/ml	4ug/ml
FB40	128ug/ml	4ug/ml
FB42	128ug/ml	8ug/ml
FB50	128ug/ml	4ug/ml
FB54	128ug/ml	2ug/ml
FB61	128ug/ml	4ug/ml
FB63	8ug/ml	4ug/ml
FB75	8ug/ml	4ug/ml
FB78	8ug/ml	4ug/ml
FB83	128ug/ml	8ug/ml
FB87	128ug/ml	8ug/ml
FB94	128ug/ml	8ug/ml
MG5990	128ug/ml	4ug/ml
MG6080	64ug/ml	16ug/ml
MG7564A	128ug/ml	4ug/ml
MG7564B	64ug/ml	4ug/ml

MG7566	128ug/ml	8ug/ml
MG7567	64ug/ml	2ug/ml
MG886	128ug/ml	8ug/ml
MG889	128ug/ml	4ug/ml
MG890	128ug/ml	4ug/ml
PR882	64ug/ml	16ug/ml
PR883	128ug/ml	4ug/ml
PR885	128ug/ml	2ug/ml
PR887	128ug/ml	4ug/ml
PR888	128ug/ml	4ug/ml
PR891	2ug/ml	4ug/ml
PR893	128ug/ml	4ug/ml
PR896	128ug/ml	1ug/ml
PR898	128ug/ml	4ug/ml
PR902	128ug/ml	4ug/ml
PR906	128ug/ml	8ug/ml
PR908	64ug/ml	4ug/ml

*Tabela 01 - Os resultados foram analisados de forma visual, onde o CIM (concentração inibitória mínima) tanto para Fluconazol quanto para anfotericina B (fármacos classificados como fungistáticos), foi aquela em que se observou 100% de inibição do crescimento fúngico. Coluna 01, representando as amostras por grupo de origem (FB: Franciso Beltrao, MG: Belo Horizonte, PR: Curitiba), coluna 02, CIM para fluconazol, coluna 03, CIM para anfotericina B, ambos em ug/ml e leitura realizada em 48 horas.

De todas as amostras testadas, abrimos exceção para a amostra FB04, a qual apresentou CIM para anfotericina B de 0,0156ug/ml, distante das demais, conforme pode se observar pela tabela 05. Com exceção das amostras FB01, FB39, FB63, FB75, FB78, MG6080, MG7564B, MG7567, PR882, PR891 E PR908, todas as amostras apresentaram CIM para a maior concentração do fármaco Fluconazol testado (128ug/ml). Já para as amostras FB01e PR891 a CIM resultou em 2ug/ml.

Para o fármaco anfotericina B, as amostras MG6080 e PR882, apresentaram como CIM 16ug/ml. A amostra FB04, apresentou como CIM 0,0156ug/ml e a amostra PR896 1ug/ml. As demais amostras apresentaram valores de CIM de forma mais uniforme. Podemos inferir que os valores de CIM para anfotericina B, apresentaram diferentes valores entre as amostras, porém não distantes, quando comparados aos valores de CIM para fluconazol, dessa maneira, observa-se maior resistência antifúngica ao fluconazol e melhor sensibilidade à anfotericina B.

Formação de biofilme

A formação de biofilme é um fator de virulência considerável para a *Candida Albicans*, como função primordial confere nutrição e proteção da levedura, através da

secreção de matriz extracelular. Para este fator, foi observado entre os grupos avaliados, há expressão uniforme de biofilme pelas amostras, no entanto, com uma diferença significativa quando comparada a amostra controle ATCC, como pode ser observado, em valores, na tabela abaixo.

Tabela 02

FB	MG	PR	ATCC
0,6561	0,5780	1,1613	3,6582
1,3677	1,2987	0,7525	
0,9929	1,0186	1,4041	
0,7358	1,7996	1,5799	
1,2256	1,5895	1,2648	
1,0667	1,2242	0,9364	
1,0311	1,7232	1,7188	
1,1202	1,6842	1,0852	
0,5826	1,1734	1,6753	
1,7657		0,9512	
1,0896		0,8153	
1,0743		0,8742	
1,3674			
1,5125			
0,9260			
0,9094			
1,0101			
1,7003			

*tabela 01 – Coluna FB (Francisco Beltrao), coluna MG (Belo Horizonte), coluna PR (Curitiba), coluna ATCC (amostra controle). Os valores apresentados na tabela, representam os valores da formação de biofilme, após os tratamentos estatísticos referenciados no texto principal.

Ao se identificar a presença de diferença em valores da ATCC em relação aos isolados, os mesmos passaram por tratamento estatístico com os testes Shapiro-Wilk Test e Teste T, indicando a presença de diferença em que todas as regiões diferem da ATCC, havendo a necessidade de testes adicionais. Após a aplicação do teste Holm's Method, certificou-se que a diferença ainda permanece significativa, indicando que as três regiões diferem da ATCC.

Debate/discussão

Este trabalho, procurou analisar diferentes perfis de virulência da *Candida albicans*, sendo a capacidade de crescimento em diferentes temperaturas, como primeiro fator. Levando em consideração que a capacidade de crescimento em temperaturas elevadas é um dos fatores primordiais para a patogênese dos microorganismos ⁹, nesta pesquisa, observou-se que todas as amostras tiveram crescimento em todas as temperaturas testadas, as quais variaram entre 28°C à 45°C, semelhante ao trabalho de Valério 2020¹⁰, onde apresenta que 73% dos isolados clínicos de *candida albicans* apresentaram crescimento robusto na faixa de 45°C. Diversos trabalho tem mostrado que os microorganismos tem se adaptado cada vez mais as elevadas temperaturas da Terra^{11,12,13 14} impactando diretamente o equilíbrio do ecossistema, influenciando na interação patógeno-hospedeiro e na respostas aos antimicrobianos ¹⁴.

Para o fator de atividade extracelular enzimática para proteinase e fosfolipase, os quais estão ligados a danos teciduais no hospedeiro e auxiliam na obtenção de fatores nutricionais aos fungos ^{15,16}, nosso trabalho evidenciou a presença de atividade de enzimas extracelulares, proteinases e fosfolipases, entre as amostras de diferentes origens, não tendo diferença estatística significativa. A atividade enzimática produzida por *Candida albicans* é expressa de forma evidente no trabalho de Abrao 2022¹⁷, quando concluiu em seus resultados, um percentual de atividade enzimática, tanto para proteinase quanto para fosfolipase de 84 e 92% respectivamente. Para Menezes et.al, 2016¹⁸, em seu estudo in vitro, evidenciaram atividade enzimática de fosfolipase positiva, variando entre leve e moderada em 87,5% das amostras de *Candida albicans* estudadas, porém ao se avaliar atividade de proteinase, concluíram que suas amostras não obtiveram atividade enzimática.

Analisando outros estudos, foi encontrado diferença significativa na produção de fosfolipases ao se analisar amostras de *candida albicans* em pacientes HIV positivos e isolados livres do vírus, obtendo maior prevalencia de atividade enzimática no grupo de pacientes imunossuprimidos em comparação ao grupo isento de infecção pelo vírus ^{19,20}.

Morfogênese, fator que tem como característica propiciar a adesão, invasão, dano tecidual, disseminação e evasão do sistema imunológico do hospedeiro, contribuindo assim de forma direta para patogênese do microorganismo ^{21,22}. Como

resultados observamos a presença de algum grau de filamentação em 75% das amostras testadas, sendo essas dos diferentes grupos testados, indo de encontro ao trabalho de Fermiano et al., 2018 ²³, onde constata em seu estudo a capacidade de filamentação das amostras em um percentual de 87%.

A produção de tubo germinativo é um dos fatores de virulência expressados pela *Candida albicans*, onde confere ao microorganismo a capacidade de colonização e infecção ²⁴. Em nosso estudo, após a incubação de suspensões imersas em soro bovino fetal a 35°C, observamos que 55% das amostras (Francisco Beltrão, Curitiba e Minas Gerais), apresentaram formação de tubo germinativo. Em outro estudo in vitro, ao se analisar a formação de tubo germinativo entre dois grupos, sendo o primeiro de colonização e outro de infecção, Negri 2010 ²⁵ constatou que a % média de células germinando no período de 2 horas diferiu entre os dois grupos analisados.

Formação de biofilme, está relacionado com a capacidade dos microorganismos colonizarem um determinado sítio, que com o passar do tempo, secretam uma matriz extracelular a qual tem função de proteção e nutrição. Em *Candida albicans* se expressa como fator de virulência, indicando a perpetuação infecciosa, tanto em ambientes bióticos como também em abióticos ^{26,27,28}. Nesse sentido, após se realizar o teste para formação de biofilme, identificamos uma formação em massa, com valores uniformes em todas as amostras dos diferentes grupos, submetidas ao meio específico, variando entre 0,51- 1,79, através de leitura da passagem de luz, o que quando comparada a cepa controle ATCC, encontrou-se diferença estatística com um valor expresso em 3,65. Nossos resultados foram semelhantes aos de Valério 2020 ¹⁰, onde apresenta formação de biofilme em todas as amostras clínicas testadas.

Dentre as drogas utilizadas no manejo de infecções fúngicas invasivas, destacam-se os antimicrobianos triazólicos, como o fluconazol e os polienicos como anfotericina B. A anfotericina B é indicada quando há casos graves de doença invasiva, atuando na membrana celular fúngica através da afinidade pelo ergosterol, interfere na permeabilidade e funções de transporte devido a capacidade de formar poros e assim ocasionar a perda de K⁺ de forma extracelular, levando a levedura a morte. Já o fluconazol é responsável pela inibição da atividade enzimática fúngica, evitando a conversão de lanosterol em ergosterol ²⁹.

Dentre os métodos de avaliação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, a microdiluição em caldo (MD) foi padronizado e publicada pelo

clinical and laboratory standards institute (CLSI) e é aceita como padrão-ouro para avaliação da suscetibilidade antifúngica de *candida* sp. O método tem como objetivo, através de uso de meios líquidos, avaliar o crescimento de *candida* em diferentes concentrações do fármaco, preparado em forma de diluições seriadas ³⁰. Essa técnica é considerada quantitativa, por ser capaz de determinar a concentração inibitória mínima (CIM), que é a menor concentração da droga antifúngica capaz de inibir visivelmente o crescimento do microorganismo fúngico ³¹.

Ao se analisar, neste trabalho, o perfil de sensibilidade aos antifúngicos, através do método de MD, observou-se que para o fluconazol, entres os diferentes grupos analisados (FB, MG e PR), 70% das amostras apresentaram resistência em 64ug/ml, ou seja, até a maior concentração do fármaco testado, houve resistência por grande parte das amostra, o que diferiu em relação ao trabalho de Valério 2020 ¹⁰, onde os isolados clínicos, apresentaram como resultado para o mesmo fármaco, 42% de resistência. Em um estudo realizado por Viera et al., 2017 ³², todas as suas amostras ao serem expostas ao fármaco fluconazol, nas concentrações testadas, apresentaram sensibilidade a droga antifúngica. Demito et al. 2012 ³³, após avaliar o perfil de suscetibilidade aos antifúngicos de espécies do gênero *Candida* de pacientes internados no Hospital Universitário Regional de Maringá-PR (HURM), concluiu que todos os isolados de *candida albicans* apresentaram 100% de sensibilidade seguindo o método de microdiluição em caldo.

Quanto ao perfil de sensibilidade para anfotericina B, no presente trabalho, obteve-se valores distintos entre as amostras das diferentes origens, com valores de CIM variando entre 1-8ug/ml. Outros estudos utilizando este mesmo fármaco em isolados clínicos de *candida albicans*, constataram sensibilidade a anfotericina B em 100% amostras ^{33,10}.

Materiais e métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) sob o protocolo 3.611.523 em outubro de 2019 com atualização 4.579.204 em março de 2021 e o termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido dos participantes.

Foram utilizadas 39 amostras de isolados clínicos de *Candida albicans* de diferentes localidades e 1 amostra controle ATCC. 21 isolados clínicos oriundos de paciente com outras alterações que não HIV (Curitiba- PR e Belo Horizonte-MG) e 18 isolados clínicos de pacientes portadores do HIV (SAE/CTA Francisco Beltrão- PR).

Para o preparo das amostras, foi realizado o enriquecimento em caldo BHI (caldo infusão cérebro coração) suplementado com 20% de glicose e armazenados a -20°C para uso durante o período de pesquisa. Anteriormente a cada teste, as amostras eram cultivadas em Batata Dextrose Ágar (BDA) por 24 horas a 35°C. Padronização do inóculo, em espectrofotômetro (Spectrum meter SP- 2000UV) a 530 nanômetros em 75-77% T (transmitância), o equivalente a 0,5 da escala McFarland.

Para análise da termotolerância, os inóculos padronizados, foram inseridos em (BDA) por 48 horas em duplicata nas seguintes temperaturas, 25, 28, 35, 37 e 42°C. Após decorrido o período, as placas foram abertas em fluxo laminar e analisadas de forma visual o crescimento de cada uma ³⁴.

Para morfogênese, usou-se o meio Ágar Spider (1% de caldo nutriente, 0,2% de K₂PO₄, 1% de manitol, 1,35% de ágar), o inóculo padronizado foi inserido ao meio sólido e incubado por 7 dias a 35°C. Sua leitura foi realizada através da avaliação visual do grau de filamentação expressado por cada isolado, classificado em (+++) alto grau de filamentação, (++) médio grau de filamentação e (-) ausência de filamentação ³⁵.

Proteinase, os inóculos foram submetidos ao meio de cultura YNB 1,17% (Yeast Nitrogen Base) acrescido de uma suspensão de BSA 0,2% (albumina ultrapurificada), dextrose 1% e 0,1% de extrato de levedura, YNB e BSA dissolvidos em água destilada estéril e esterilizados por filtração. Após este procedimento foi adicionado solução de ágar estéril a 1,8% ³⁶ e vertidos em placas de petri. Incubados a 28°C por 7 dias ¹⁰. Decorrido o tempo, o halo de clarificação ao redor da colônia crescida foi analisado e realizado e medido para verificar o valor de Pz.

Para a atividade enzimática de fosfolipase, foi utilizado o meio Egg Yolk ágar,

conforme descrito por Price (1982)³⁷, sendo preparado com BDA 6,5%, NaCl 5,58% CaCl_2 0,055% e emulsão de gema de ovo estéril 8% 1:1 (50% salina estéril 0,9% e 50% gema de ovo), com exceção da solução gema de ovo, os meios foram autoclavados à 121°C por 15 min e resfriados em banho maria até 45°C para então ser acrescentada a emulsão de gema de ovo, finalizando com o meio vertido nas placas de petri, incubados a 35°C por 4 dias. A leitura do resultado foi feita a partir do diâmetro dos halos (em mm) formados, sendo a atividade enzimática calculada como a razão do diâmetro da colônia e o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação. Amostras negativas para produção de fosfolipases $P_z=1$, amostras positivas para fosfolipases $P_z<1$, amostras fortemente positivas para fosfolipases valor $>$ ou $=$ a 0,63 (11).

Para formação de biofilmes, foi utilizado como meio de cultura, caldo sabouraud (SBA), em microplacas de 96 poços. Coluna 01, como controle de esterilidade, os poços foram preenchidos apenas com meio estéril, as colunas seguintes foram acrescidas do meio esterilizado juntamente com os inóculos padronizados nos respectivos poços (50ul). As placas foram incubadas à 35°C em incubadora orbital (SHAKER, MARCONI MA-420, Piracicaba, SP) em movimento de 75 rpm (rotações por minuto) por 90 min com objetivo de adesão inicial das células fúngicas, e então lavadas com solução salina 0,9%, para novamente serem preenchidas com o meio estéril por até 48 horas.

Ao final, as placas passaram por tratamento com metanol 33%, corante cristal violeta 0,02% e ácido acético 99%, transferido para uma nova microplaca estéril e realizado sua leitura em leitor de microplacas (Thermofischer Scientific, VarioSkan LUX) em um comprimento de onda de 530 nanômetros. A cada 24 horas do teste, todos os poços passaram por tratamento de remoção do sobrenadante, lavagem com salina estéril 0.9%, preenchimento com meio estéril e incubadas da mesma forma³⁸.

Para avaliação de formação de tubo germinativo, utilizou-se soro bovino como meio, inserido alíquotas de cultura de 24 horas a 35°C, incubados 2-3 horas por 35°C. Como leitura, inseriu-se entre lâmina e lamínula uma gota da suspensão incubada e uma gota de corante violeta genciana, levadas ao microscópio em objetiva de 40x 0.70 (Physis, China) para se verificar a presença de tubo germinativo³⁹.

O perfil de sensibilidade foi avaliado conforme protocolo CLST 2008 com uso dos fármacos anfotericina B e fluconazol em meio de cultura RPMI (Roswell Park Memorial Institute), procedendo o preenchimento em microplacas de 96 poços,

conforme esquematizado na figura 04.

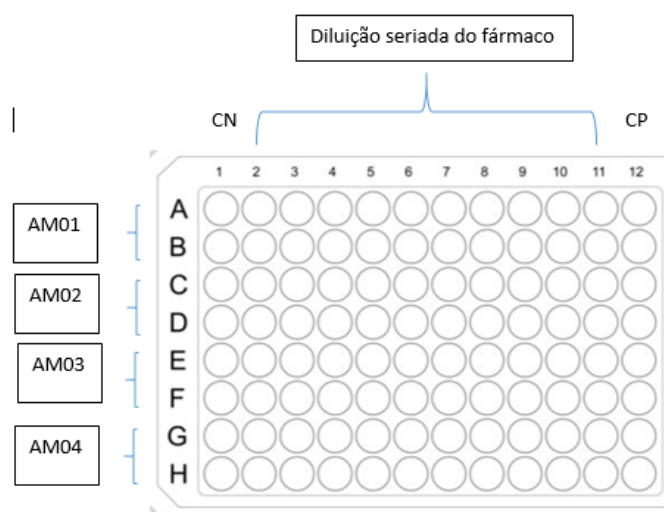


Figura 04 *Esquema de microdiluição em placa de 96 poços. Coluna 01= controle negativo (meio estéril), coluna 02 a coluna 11 meio de cultura (RPMI) mais fármaco entre 08-0,0156ug/ml (anfotericina B) e 64-0,125ug/ml (fluconazol) acrescido de 50ul de inóculo padronizado e diluído 1:20 e posterior 1:50, coluna 12 meio acrescido do inóculo padronizado e diluído para controle positivo de crescimento.

Após o preenchimento de cada placa, foram incubadas a 35°C por 48 horas, sendo a leitura realizada a cada 24 horas. Ao final, através de análise visual, observou-se qual a concentração inibitória mínima do fármaco em 100% do crescimento fúngico.

Agradamentos

Esta pesquisa só foi possível devido, ao Professor Volmir Pitt Benedetti, responsável pelas amostras de Francisco Beltrão, Universidade Paranaense (UNIPAR). Professora Susana Johann responsável, pelas amostras de Minas Gerais do instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Professor Flavio de Queiroz Telles Filho, Universidade Federal do Paraná (UFPR), responsável pelas amostras de Curitiba- PR. Professora Lirane Elize Defante Ferreto, diretora do centro de ciências da saúde, Universidade do Oeste do Paraná (UNIOESTE), campus Francisco Beltrão- PR. Mayara Rossi ex-técnica do Laboratório de microbiologia do Centro de Ciências da Saúde Francisco Beltrão - PR, e Maiara Manzoni Seerig, Mestre em Ciências aplicadas a Saúde pela UNIOESTE Francisco Beltrão- PR.

Referências:

- 1 KAUR, G; CHAWLA, S; KUMAR, P; SINGH, R. Advancing Vaccine Strategies against *Candida* Infections: Exploring New Frontiers. **Vaccines (Basel)**, v. 11, n. 11, p. 1658, nov. 2023.2023 Oct 29;11(11):1658. doi: 10.3390/vaccines11111658. PMID: 38005990 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38005990>.

- 2 PARENTE, L. H. N; BARROS, N. B. de; ARAUJO, R. A. B. de. Incidência de doenças produzidas por fungos *Candida albicans* e *glabrata* e os mecanismos de resistência aos antifúngicos. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 7, n. 9, p. e76023, 2024. DOI: 10.34119/bjhrv7n9-413. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJHR/article/view/76023>.

- 3 NOBILE, C. J; JOHNSON, A. D. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. **Annual Review of Microbiology**, v. 69, p. 71–92, 2015. Doi: 10.1146/annurev-micro-091014-104330. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26488273/> .

- 4 STUCKEY, P. V; SANTIAGO-TIRADO, F. H. Fungal mechanisms of intracellular survival: what can we learn from bacterial pathogens? **Infection and Immunity**, v. 91, n. 9, p. e00434-22, 14 set. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37506189/>.

- 5 REVIE, N. M; IYER, K. R; ROBBINS, N; COWEN, L. E. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. **Current Opinion in Microbiology**, v. 45, p. 70–76, out. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29547801/>.

- 6 PRISTOV, K. E; GHANNOUM, M. A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 7, p. 792–798, jul. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X19301491>.

- 7 SHAPIRO, R. S; ROBBINS, N; COWEN, L. E. Regulatory Circuitry Governing Fungal Development, Drug Resistance, and Disease. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, n. 2, p. 213–267, jun. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mnbr.00045-10>.

- 8 CZAJKA, K. M; VENKATARAMAN, K; KIRWAN, D.B; SANTI, S. A; VERSCHOOR, C; APPANNA, V. D; SINGH, R; SAUNDERS, D. P. Molecular Mechanisms Associated with Antifungal Resistance in Pathogenic *Candida* Species. **Cells**, v. 12, n. 22, p. 2655, nov. 2023. doi: [10.3390/cells12222655](https://doi.org/10.3390/cells12222655) Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/12/22/2655>.

- 9 LEACH M. D; FARRER R. A; TAN K; MIAO Z; WALKER L. A; CUOMO C. A; WHEELER R. T; BROWN A. J; WONG K. H; COWEN L. E. Hsf1 and Hsp90 orchestrate temperature-dependent global transcriptional remodelling and chromatin architecture in *Candida albicans*. **Nat Commun**. 2016 May 26; 7: 11704. doi: 10.1038/ncomms11704. PMID: 27226156.

- 10 VALÉRIO, D. A. análise de aspectos da virulência e resistência a antifúngicos de isolados clínicos e ambientais de *Candida albicans*. Tese apresentada para obtenção do título de doutorado em microbiologia do instituto de ciências biológicas da

Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte- MG, 2020.

11 ALTIZER, S. et al. Climate Change and Infectious Diseases: From Evidence to a Predictive Framework. **Science**, v. 341, n. 6145, p. 514–519, 2 ago. 2013. doi: 10.1126/science.1239401.

12 RAFFEL, T. R. et al. Disease and thermal acclimation in a more variable and unpredictable climate. **Nature Climate Change**, v. 3, n. 2, p. 146–151, fev. 2013.

13 MAYNARD, J. et al. Projections of climate conditions that increase coral disease susceptibility and pathogen abundance and virulence. *Nature Climate Change*, v. 5, n. 7, p. 688–694, jul. 2015

14 CAVICCHIOLI, R. et al. Scientists' warning to humanity: microorganisms and climate change. *Nature Reviews Microbiology*, v. 17, n. 9, p. 569–586, set. 2019. CDC - CANDIDISIS. Disponível em: <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/index.html>

15 SCHALLER, M. et al. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*, v.48, n.6, p.365-377, nov.2005

16 RAPALA-KOZIK, M. et al. Extracellular proteinases of *Candida* species pathogenic yeasts. **Molecular Oral Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 113-124, abr. 2018.

17 ABRAO, YF; MARRETO, L. C. N. L; CARVALHO, J. C.B; SILVA, P. H. S; CARVALHO, F. S; MORAIS, R. P; SOUZA, L. K. H. Fatores de virulência de espécies de candida isolados na saliva de profissionais da saúde. Faculdade Unida de Campinas, Goiania- GO, Brasil. *Rev. Latin American Journal of Development*, Curitiba, v.4, n.1, p.68-80, jan/feb. 2022. ISSN 2674-9297

18 MENEZES, A. E; BARBOSA, L. C. A; MARIA DA CONCEIÇÃO DOS SANTOS CUNHA, O. S. C. M; MENDES, G. L; CUNHA, A. F. Suscetibilidade a antifúngicos e fatores de virulência de *Candida albicans* spp. Isolados em Russas, Ceará. Universidade Federal do Ceará- Fortaleza, CE, Brasil. **Rev. RBCA**, v.01, p. 8-33, 2016

19 CASTELO BRANCO PV, ANJOS DCV, NASCIMENTO FB, VALE INF, AZEVEDO CMPS, MONTEIRO SG, et al. Prevalência e Produção de Exoenzimas por Espécies de *Candida* Provenientes da Mucosa Bucal de Pacientes com AIDS e Indivíduos Hígidos. **Rev Patol Trop**, v. 41, n. 4, p. 41-427, 2012.

20 BACK-BRITO GN, EL ACKHAR VN, GARBIM AL, ROMEIRO RL, JORGE AOC, BALDUCCI I, et al. HAART therapy does not reduce the proteinase and phospholipase secretion by oral *Candida albicans* isolated from HIV-positive patients. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 70, n. 2, p. 101, 2011.

21 KUMAMOTO, C. A.; VINCES, M. D. Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence: *Candida albicans* morphogenesis and virulence. **Cellular Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1546-1554, 6 set. 2005.

- 22 JACOBSEN, I. D. et al. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 10, n. 1, p. 85-93. jan. 2012
- 23 FERMIANO, H. T; ARITA, S.G; FARIA, R.D; SAKITA, M.A; VILUGRON, A. F; CAPOCI, G. R. I; MENDONCA-BONFIM, S. P; SVIDZINSK, E. I, T; KIOSHIMA, S. E. Análise de fatores de virulência de *Candida albicans* isoladas de candidemia sistêmica experimental seriada. Universidade estadual de Maringa- Maringa, PR. Out/2018.
- 24 RIBEIRO, L. E; CARDOSO, G. C; INACIO, M. M. Prevalencia e formação de tubos germinativos por isolados de *Candida albicans* oriundos de indivíduos sem DST com e sem candidíase peniana. **J. health sci inst.** 32(4);353-6, 20
- 25 NEGRI MF, FARIA MG, GUILHERMETTI E, ALVES AA, PAULA CR, SVIDZINSKI TIE. Hemolytic activity and production of germ tubes related to pathogenic potential of clinical isolates of *Candida albicans*. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 31, n. 1, p. 89-93, 2010.
- 26 DE GROOT, P. W. J. et al. Adhesins in Human Fungal Pathogens: Glue with Plenty of Stick. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 4, p. 470–481, abr. 2013.
- 27 RAMAGE, G. et al. *Candida* Biofilms: an Update: FIG. 1. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 4, p. 633–638, abr. 2005.
- 28 NETT, J. E. et al. Role of Fks1p and Matrix Glucan in *Candida albicans* Biofilm Resistance to an Echinocandin, Pyrimidine, and Polyene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 8, p. 3505–3508, 1 ago. 2010.
- 29 VIEIRA, H. J. A; SANTOS, I. J. Mecanismos de resistência de *cândida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. **Rev. Brasileira de análises clínicas**. Fev. 2016 doi: 10.21877/2448-33877.201600407.
- 30 SPALANZANI, N. R. Principais métodos de diagnóstico laboratorial e de avaliação da suscetibilidade antifúngica de *Candida* sp. Artigo apresentado para título de pós-graduação em ciências farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2018.
- 31 KUPER, K. M.; BOLES, D. M.; MOHR, J. F.; WANGER, A. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Primer for Clinicians. **Pharmacotherapy**, v. 29, n. 11, p. 1326–1343, 2009
- 32 VIEIRA, A. C; SOUZA, R. W. W; LIMA, S. J; GOULART, S.L. estudo comparativo de las espécies de *Candida*: sensibilidad antifúngica y genes de virulência. **Multitemas**, Campo Grande, MS, v. 23, n. 54, p. 169-182, maio/ago. 2018.
- 33 DEMITTO, F. O; AMARAL, R. C. R; BIASI, P. R; GUILHERMETTI, E; SVIDZINSK, E. I. T; BAEZA, C. L. Suscetibilidade a antifúngicos in vitro de *Candida* spp. em pacientes do Hospital Universitário Regional de Maringá-PR. **J Bras Patol Med Lab**. v. 48, n. 5, p. 315-321, outubro 2012.

- 34 ZEUTHEN, M. L.; HOWARD, D. H. Thermotolerance and the Heat-shock Response in *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 135, n. 9, p. 2509–2518, 1 set. 1989. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2697750/>
- 35 CALERA, J. A.; ZHAO, X.-J.; CALDERONE, R. Defective Hyphal Development and Avirulence Caused by a Deletion of the SSK1 Response Regulator Gene in *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, p. 518–525, 1 fev. 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10639412/> .
- 36 CASSONE, A; BERNARDIS, F; FRANCESCA, M; CEDDIA, T; AGATENSI, L. Evidence for a Correlation Between Proteinase Secretion and Vulvovaginal Candidosis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 156, n. 5, p. 777–783, 1 nov. 1987. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3309073/>.
- 37 PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 20, n. 1, p. 7–14, jan. 1982. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7038928/> .
- 38 SENEVIRATNE, C. J; SILVA, W. J; JIN, L. J; SAMARANAYAKE, Y. H; SAMARANAYAKE, L. P. Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. **Archives of Oral Biology**, v. 54, n. 11, p. 1052–1060, nov. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19712926/>.
- 39 RIBEIRO, L. V; CARVALHAES, S. M; CAMPOS, C. C; CARDOSO, G. C; TOLEDO, A, O; PIMENTA, C. F. Tubo germinativos na genotipagem de isolados de *Candida albicans* de crianças com síndrome de down e pais e/oi responsáveis. **ClipeOdonto-UNITAU**, v. 2, n. 1, p. 34-38, 2010 disponível em: periodicos.unitau.br

Anexos

1 Parecer do comite de ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) sob o protocolo 3.611.523 em outubro de 2019 com atualização 4.579.204 em março de 2021 e o termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido dos participantes.

2 Carta de submissão

To the Editor, *mLife*

We are pleased to submit our manuscript, titled "**Virulence Factors and Antifungal Susceptibility Profiles of Clinical *Candida albicans* Isolates from HIV-Positive and HIV-Negative Patients: An In Vitro Experimental Study**", for consideration as a Research Article in *mLife*.

Fungal infections, particularly those caused by the genus *Candida*, represent a growing global health concern, with increasing virulence and antifungal resistance. Our study addresses this critical issue by analyzing the virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolates from both HIV-positive and HIV-negative patients. The research aims to identify potential differences in resistance patterns and fungal invasion capacity between these two groups, a topic of significant relevance given the rising rates of fungal infections in immunocompromised populations.

Our key findings highlight the diversity in virulence factor expression among *C. albicans* isolates, with distinct patterns observed in morphogenesis, phospholipase, and proteinase production. Furthermore, our results emphasize the importance of understanding the mechanisms of pathogenicity and antifungal resistance, providing a foundation for developing more effective diagnostic and therapeutic strategies.

We believe that our study is well-suited for publication in *mLife* due to its strong focus on microbial pathogenicity, host-pathogen interactions, and the pressing issue of antimicrobial resistance. The findings contribute new insights into the behavior of a major human pathogen in different patient populations and align with the journal's scope of publishing high-impact research at the intersection of life sciences.

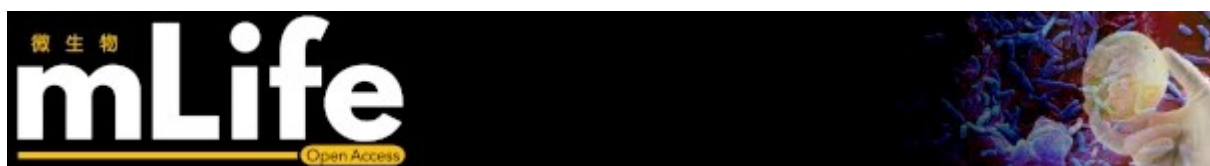
The authors declare that the manuscript has not been published previously and is not under consideration for publication elsewhere. All authors have approved the final manuscript and have no competing interests to disclose.

Thank you for your consideration. We look forward to your decision.

Sincerely,

Cleide Viviane Buzanello, Prof, PhD

3 Normas da revista



Diretrizes para autores

Submissão em formato livre

O mLife agora oferece **envio em formato livre** para um processo de envio simplificado e agilizado.

Antes de enviar, você precisará:

- Seu manuscrito: este deve ser um arquivo editável, incluindo texto, figuras e tabelas, ou arquivos separados — o que você preferir. Todas as seções obrigatórias devem estar contidas em seu manuscrito, incluindo resumo, introdução, métodos, resultados e conclusões. Figuras e tabelas devem ter legendas. As figuras devem ser enviadas na maior resolução possível. Se as figuras não forem de qualidade suficientemente alta, seu manuscrito poderá sofrer atrasos. As referências podem ser enviadas em qualquer estilo ou formato, desde que sejam consistentes em todo o manuscrito. As informações de apoio devem ser enviadas em arquivos separados. Se o manuscrito, as figuras ou as tabelas forem difíceis de ler, também serão difíceis para os editores e revisores, e a redação os enviará de volta para você para revisão. Seu manuscrito também poderá ser enviado de volta para você para revisão se a qualidade do inglês for ruim.
- Um ID ORCID, disponível gratuitamente em <https://orcid.org>. (*Por que isso é importante? Seu artigo, se aceito e publicado, será anexado ao seu perfil ORCID. Instituições e financiadores estão cada vez mais exigindo que os autores tenham IDs ORCID.*)
- A página de título do manuscrito, incluindo:
 - Dados do seu coautor, incluindo afiliação e endereço de e-mail. (*Por que isso é importante? Precisamos manter todos os coautores informados*

sobre o resultado do processo de revisão por pares.)

- Declarações relacionadas às nossas políticas de ética e integridade, que podem incluir qualquer uma das seguintes (*Por que elas são importantes? Precisamos manter padrões éticos rigorosos para as pesquisas que consideramos para publicação*):
 - declaração de disponibilidade de
 - dados declaração de financiamento
 - divulgação de conflito de interesses
 - declaração de aprovação ética
 - declaração de consentimento do paciente permissão para reproduzir material de outras fontes registro de ensaio clínico

Página de título

A página de título deve conter:

- i. Um breve título informativo com menos de 90 caracteres;
- ii. Os nomes completos dos autores;
- iii. Afiliações institucionais do autor onde o trabalho foi realizado, com uma nota de rodapé para o endereço atual do autor, se diferente de onde o trabalho foi realizado;
- iv. Autor(es) correspondente(s) e endereço(s) de e-mail;
- v. Agradecimentos

Arquivo de texto principal

O arquivo de texto principal deve estar no formato Word.

O arquivo do documento principal deve ser preparado da seguinte maneira.

• Resumo

É um parágrafo separado para resumir a declaração do problema, o objetivo, o método adotado, as principais descobertas e a importância ou implicações dos

resultados. O texto deve ter menos de 250 palavras.

• **Declaração de Impacto**

Os autores devem apresentar uma Declaração de Impacto antes do texto principal, EM LINGUAGEM LEIGA, destacando a novidade e a importância para um público amplo. O texto deve ter menos de 100 palavras.

• **Palavras-chave**

No máximo cinco palavras-chave devem ser listadas abaixo da Declaração de Impacto.

• **Introdução**

Esta seção tem como objetivo apresentar o contexto, as lacunas de conhecimento, as questões, as hipóteses e os objetivos da pesquisa.

• **Resultados**

Esta seção tem como objetivo fornecer um resumo das principais descobertas da pesquisa.

• **Discussão**

Esta seção deve resumir os principais resultados, descrever as relações com outros trabalhos e destacar a novidade e a importância da pesquisa. Os resultados e a discussão podem ser combinados, se for mais adequado para a apresentação.

• **Materiais e métodos**

Esta seção tem como objetivo apresentar os materiais, procedimentos padrões, métodos apropriados, métodos estatísticos, etc. Todos os novos materiais e procedimentos devem ser descritos com detalhes suficientes para permitir sua reprodução.

• **Agradecimentos**

Os autores devem reconhecer as pessoas que contribuíram para o trabalho apresentado, mas que não atendem aos critérios de autoria. Além disso, devem ser listadas as agências de financiamento e as bolsas que apoiam diretamente o

trabalho.

• Referências

Todas as referências diretamente relacionadas a este artigo devem ser citadas e listadas honestamente. No texto principal, as referências devem ser numeradas na ordem em que são citadas.

Este periódico utiliza o estilo de referência Vancouver; como o periódico oferece submissão em formato livre, este formato é apenas informativo e você não precisa formatar as referências no seu artigo. Isso será feito pelo editor.