



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO – REABILITAÇÃO ORAL



FILIPE SANTOS FERREIRA MENDES

**“Análise comparativa de *Candida* spp. isoladas de pacientes usuários de próteses totais com e sem o diagnóstico de HIV”**

RIBEIRÃO PRETO  
2021



FILIPE SANTOS FERREIRA MENDES

**“Análise comparativa de *Candida* spp. isoladas de pacientes usuários de próteses totais com e sem o diagnóstico de HIV”**

**Versão Corrigida**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências, junto ao Programa de Pós-graduação em Odontologia.

Área de concentração: Reabilitação Oral.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Helena de Freitas Oliveira Paranhos

RIBEIRÃO PRETO

2021

Autorizo a reprodução e divulgação do teor total ou parcial deste trabalho por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Mendes, Filipe Santos Ferreira

Análise comparativa de *Candida* spp. isoladas de pacientes usuários de próteses totais com e sem o diagnóstico de HIV. Ribeirão Preto, 2021

110 p.: il ; :30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Reabilitação Oral.

Versão corrigida

Orientador: Prof. Dr. Helena de Freitas Oliveira Paranhos.

1.Prótese Total. 2.*Candida albicans* 3. Fatores de Virulência 4. Biofilmes 5. HIV 6. Terapia Antirretroviral de Alta Atividade.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

MENDES, Filipe Santos Ferreira. **Análise comparativa de *Candida* spp. isoladas de pacientes usuários de próteses totais com e sem o diagnóstico de HIV.** 2021. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### BANCA EXAMINADORA

Prof.(a). Dr.(a).: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.(a). Dr.(a).: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.(a). Dr.(a).: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_



---

# DEDICATÓRIA

---





Dedico este estudo a todas as **mulheres**, nascidas assim, ou que se identificam como uma. Em vocês moram a força da vida, da luta e do amor. Amor a mim entregue por duas lutadoras, **Edriana Santos Urias** e **Elenice Barbosa dos Santos**, duas mães que nunca conseguirei retribuir tudo que me ofereceram, todo apoio, todos os ensinamentos. Com vocês aprendi o significado da palavra respeito, honestidade e trabalho. Construí e continuarei construindo minha vida e minha carreira baseada em tudo que vivemos juntos.

Dedico ao meu irmão, **Gabriel Mendes** por todo o companheirismo e respeito, olho para você e sinto orgulho por poder fazer parte da construção de uma personalidade tão maravilhosa e que sei que irá brilhar muito em muitos aspectos.

Dedico ao meu namorado, **Lucas Silva da Cruz** por todo o apoio em tantos momentos decisivos em minha vida. Presente que a força divina me deu para enfrentar momentos difíceis, com forças para sonhar com um futuro melhor.

Dedico aos meus tios, **Jaide Santos Urias** e **Rose Cristina Lopes da Cruz**, pelo apoio durante minha graduação, por me mostrar a verdadeira força que uma família unida pode ter.

Dedico, a todos os anjos que me mantiveram no caminho nesta jornada tão desafiadora e a todos os estudantes de baixa renda que sonham com uma carreira promissora em um país tão desigual.

Dedico finalmente a todas as mais de 580 mil vítimas da pandemia de COVID-19 no Brasil, o maior desastre sanitário da nossa geração até hoje.



---

# AGRADECIMENTOS

---



A minha orientadora, Prof<sup>a</sup>; Dr<sup>a</sup>. **Helena de Freitas Oliveira Paranhos** que mesmo em tempos adversos me orientou e possibilitou a realização de um trabalho tão importante para minha realização acadêmica e pessoal.

A **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Helena Lovato da Silva**, pelo apoio na elaboração do projeto, mesmo antes da minha entrada no mestrado.

A **Viviane de Cássia Oliveira**, responsável técnico pelo laboratório onde a análise foi realizada, pelo longo e difícil trabalho realizado, pela dedicação e paciência envolvida.

Aos professores doutores **Allan Grupioni** e **Evandro Watanabe** pelo apoio técnico concedido durante a realização dos testes desse estudo.

A **Ana Paula Macedo** pela paciência e disponibilidade durante a elaboração do projeto e análise dos resultados obtidos.

Ao **Prof. Dr. Leandro Dorigan** e **Prof. Ana Laura Polizel Ranieri** pelo apoio concedido na elaboração e realização do estudo.

Ao auxílio financeiro imprescindível na realização do projeto, disponibilizado pelo processo n° 2019/10299-0, **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** também pelo auxílio financeiro oferecido ao estudo.”

A **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo** pelo excepcional ensino entregue, assim como ao **Programa de pós-graduação em Odontologia (Reabilitação Oral)** e seus excelentes professores.

Ao **Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto** pelos anos de aprendizado e por servir como plataforma para pesquisas com qualidade reconhecida mundialmente.

Aos meus **amigos**, por me ajudarem a ter uma vida mais leve e feliz.



---

# RESUMO

---





MENDES, F.S.F. **Análise comparativa de *Candida* spp. isoladas de pacientes usuários de próteses totais com e sem o diagnóstico de HIV.** 2021. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

A estomatite protética é uma inflamação da mucosa do tecido de suporte de próteses totais, tem um de seus fatores a colonização por *Candida* spp. O objetivo deste estudo foi avaliar a prevalência, virulência e morfologia de cepas de *Candida* spp. isoladas de biofilmes de pacientes usuários de próteses totais com estomatite relacionado a prótese (ERP), com e sem o diagnóstico de HIV. Cinquenta e cinco usuários de próteses totais com diagnóstico de ERP foram distribuídos em dois grupos: Experimental - com diagnóstico de infecção pelo vírus HIV e Controle. O biofilme foi coletado por meio do método padronizado de ultrassonificação das próteses. A prevalência foi avaliada por meio de identificação pelo método cromógeno CHROMagar *Candida* e confirmação de isolados pela reação de cadeia da polimerase (PCR). Os fatores de virulência foram mensurados por meio da capacidade de formação de biofilme pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL), do metabolismo celular pela metabolização do sal tetrazolio e da produção de proteinase e fosfolipase por kit fluorimétrico. A morfologia foi verificada por meio do teste indutor de hifas. A idade, grau de ERP, carga viral e contagem de linfócitos T-CD4+ foram coletados por formulário e, para o grupo experimental, foi avaliada a correlação entre a capacidade de formação do biofilme e ERP, carga viral e contagem de T-CD4; bem como a relação entre ERP e carga viral e contagem de linfócitos T-CD4+. Os fatores de virulência e morfologia foram comparados pelo teste t de Student, com exceção da produção de fosfolipase (*C. albicans*) e proteinase (não-*albicans*), os quais foram comparados pelo teste U de Mann-Whitney. Para a avaliação da idade, grau de ERP, carga viral e contagem de linfócitos T-CD4+, foram empregados o teste de Spearman e exato de Fisher. Foi utilizado nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ). Os resultados da prevalência mostraram, dos 55 pacientes (22 experimental e 33 controle), um total de 63 amostras de *Candida* spp. isoladas, sendo 28 cepas de *C. albicans* e 36 cepas não *albicans*. Não houve diferença significativa entre os grupos quanto à contagem de UFC/mL em baseline, à capacidade de formação do biofilme, ao metabolismo celular e à produção de fosfolipase; e houve maior produção de proteinase para *C. albicans* no controle ( $p=0,031$ ) e para não-*albicans* no experimental ( $p=0,016$ ). Quanto à morfologia, não houve diferença significativa entre os grupos (Controle e experimental) (*C. albicans* -  $p=0,860$ ; não-*albicans* -  $p=0,501$ ). Quanto a carga viral, para o grupo experimental, foi indetectável em 13 pacientes (59%), a contagem de

células T-CD4<sup>+</sup> foi em média de 565 células por mm<sup>3</sup>, houve correlação negativa moderada entre a contagem de UFC/mL em baseline de não-albicans e ERP ( $\rho = -0,592$ ,  $p = 0,020$ ) e não houve relação entre ERP e carga viral ( $p = 0,1772$ ), bem como entre ERP e T-CD4<sup>+</sup> ( $p = 0,3624$ ). Concluiu-se que a *C. albicans* foi a espécie mais isolada, que não houve diferença quanto às cepas de *Candida* spp. de usuários de próteses totais com ERP com e sem o diagnóstico de HIV para os fatores de virulência (exceto para produção de proteinase) e morfologia.

**Palavras-chave:** Prótese Total. *Candida albicans*. Fatores de Virulência. Biofilmes. HIV. Terapia Antirretroviral de Alta Atividade.

---

# ABSTRACT

---



MENDES, F.S.F. **Comparative analysis of *Candida* spp. isolated from complete denture wearers with and without HIV diagnosis.** 2021. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

## ABSTRACT

Denture-related stomatitis (DRS) is an inflammation of the mucosa of the supporting tissue of complete dentures, frequent in HIV+ individuals, that of main factors is the colonization by *Candida* spp. The aim of this study was to evaluate the prevalence, virulence and morphology of *Candida* spp. isolated from biofilms of complete denture wearers with denture-related stomatitis with and without HIV diagnosis. Fifty-five users of complete dentures diagnosed with DRS were divided in two groups: Experimental (HIV+) and Control (HIV-). Biofilm was collected using a standardized method of ultrasonification of prostheses. The prevalence was evaluated through identification by the chromogenic method CHROMagar *Candida*, and confirmation of isolates by polymerase chain reaction (PCR). Virulence factors were measured by the biofilm formation capacity by counting colony-forming units (CFU/mL), biofilm metabolism by tetrazolium salt metabolization, and the proteinase and phospholipase production by a fluorimetric kit. Morphology was verified using the hyphae inducing test. Health data were collected using a form and, for the experimental group, the correlation between the ability to form biofilm with DRS, viral load and CD4+T cells count were evaluated; as well as the relationship between DRS with viral load and CD4+T lymphocyte count. Virulence and morphology factors were compared by Student's T test, except for phospholipase (*C. albicans*) and proteinase (non-albicans) production, which were compared by Mann-Whitney U test. For health data, Spearman's and Fisher's exact tests were used. A significance level of 5% ( $\alpha = 0.05$ ) was used. The prevalence results included 55 patients (22 experimental and 33 control), a total of 63 samples of *Candida* spp. isolated, being 28 strains of *Candida albicans* and 36 non-albicans strains. There was no significant difference between groups regarding baseline CFU/mL count, biofilm formation capacity, cell metabolism and phospholipase production. There was a higher production of proteinase for *C. albicans* in the control ( $p=0.031$ ) and for non-albicans in the experimental ( $p=0.016$ ). Regarding the morphology, there was no significant difference between the groups (Control and experimental) (*C. albicans* -  $p=0.860$ ; non-albicans -  $p=0.501$ ). As for health data, for the experimental group, viral load was undetectable in 13 patients (59%), the CD4+T count had a mean of 565 cells per  $\text{mm}^3$ , there was a moderate negative correlation between the CFU count/mL in baseline for non-

albicans and DRS classification ( $\rho = -0.592$ ,  $p = 0.020$ ) and there was no relationship between DRS and viral load ( $p = 0.1772$ ), as well as between DRS and CD4+ T count ( $p = 0.3624$ ). It was concluded that *C. albicans* was the most isolated species, that there was no difference regarding *Candida* spp. from complete denture wearers with ERP, with and without HIV diagnosis for virulence factors (except for proteinase production) and morphology.

**Keywords:** Complete denture, *Candida albicans*, virulence factors, biofilm, phospholipases, HIV, Highly active antiretroviral therapy.

---

# SUMÁRIO

---





<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	24
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	32
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
3.1. Seleção das amostras.....	39
3.2. Das amostras de biofilme.....	40
3.3. Avaliação da prevalência e identificação de <i>Candida</i> spp.....	40
3.3.1. Identificação de <i>Candida</i> spp. por método cromógeno CHROMagar <i>Candida</i> <sup>TM</sup> .....	40
3.3.2. Confirmação da identificação de <i>Candida</i> spp. por Reação da Cadeira de Polimerase (PCR).....	42
3.3.3. Avaliação da carga microbiana por meio da mensuração de unidades formadoras de colônias (UFC/mL).....	48
3.4. Avaliação dos fatores de virulência das cepas de isolados de <i>Candida</i> spp.....	48
3.4.1. Avaliação da capacidade de formação do biofilme por meio da mensuração de unidades formadoras de colônias (UFC/mL).....	48
3.4.2. Avaliação do metabolismo celular por meio da metabolização do sal de tetrazólio.....	50
3.4.3. Avaliação da produção de proteinase e fosfolipase.....	52
3.4.4. Avaliação da capacidade de formação de hifas.....	54
3.5. Avaliação da idade, grau de ERP, carga viral e contagem de linfócitos TCD4+.....	55
3.6. Análise estatística.....	55
<b>4. RESULTADOS</b> .....	57
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	72
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	82
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	85
<b>8. APÊNDICES</b> .....	95



---

# 1. INTRODUÇÃO

---





## 1. INTRODUÇÃO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) é uma doença infectocontagiosa, sem cura, causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). A infecção teve seu primeiro caso registrado no Brasil em 1980, ano em que o mundo declarou epidemia causada pelo vírus (1,2). Décadas mais tarde, em todo o mundo, 38 milhões de pessoas são portadoras do vírus HIV (3), sendo 930 mil somente no Brasil, com 634 mil em tratamento (3). Atualmente, com o auxílio dos antirretrovirais, nem todos os pacientes portadores do vírus HIV apresentam os desdobramentos da SIDA; pelo contrário, o tratamento tem se demonstrado eficaz na manutenção do sistema imune da maioria dos pacientes. Apesar disso, diversas manifestações sistêmicas e orais são comuns nesses pacientes, tais como leucoplasia pilosa, sarcoma de Kaposi, ulcerações orais, citomegalovírus, gengivite, periodontite e infecções fúngicas (5,6). Na maior parte dos casos, as manifestações ocorrem devido ao comprometimento da imunidade do paciente; porém alguns aspectos da patogenia dessas manifestações continuam desconhecidos. Apesar do bom controle da doença por meio da terapia antirretroviral (TARV) ou Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART), a infecção oral por fungos, especialmente por *Candida albicans*, continua sendo uma das doenças oportunistas mais comuns nessa população (6).

A cepa *C. albicans* é um fungo encontrado na microbiota comensal da cavidade oral e dos tratores gastrointestinal e geniturinário de pacientes saudáveis, podendo assumir, quando há alterações ambientais, características patogênicas (7,8). Pertencente à família *Candida* spp., esta cepa vem sendo amplamente estudada devido a incidência de infecções locais recorrentes e pelo sua alta letalidade em infecções invasivas (35%) (8,9). Os principais fatores predisponentes sistêmicos para a infecção por *C. albicans* são idade avançada, tabagismo, dieta inadequada, doenças imunossupressoras, uso de medicamentos, tempo prolongado de internação hospitalar, neutropenia, nutrição parenteral, insuficiência renal, diabetes, quimioterapia e hemodiálise, entre outros (10,11). Entre os fatores locais, a diminuição do fluxo salivar e a presença de próteses, propiciam um ambiente favorável para a proliferação fúngica (10,12). A diminuição da produção de saliva acarreta uma diminuição das taxas de polipeptídios, os quais são ricos em histidina, lactoferrina, lisozima e sialoperoxidase, enzimas que auxiliam no controle do crescimento fúngico (10,12). Assim como a diminuição do fluxo salivar, as próteses dentárias, quando não higienizadas de forma e frequência adequadas, favorecem a proliferação fúngica. Devido à forma do aparelho protético, aderência microbiana à resina acrílica e baixo fluxo

salivar, aproximadamente 65% dos pacientes com próteses totais removíveis apresentam predisposição para colonização por *C. albicans* (10,13).

A infecção por *C. albicans* tem sido amplamente estudada devido as altas taxas de diagnósticos clínicos e isolamentos laboratoriais (14). A ERP, também chamada de candidose ou candidíase, é caracterizada por inflamação da mucosa de suporte, comumente da maxila, podendo ser localizada ou generalizada. Suas manifestações bucais podem ser agudas ou crônicas, apresentando diferentes níveis de gravidade (15). As formas agudas são diferenciadas em pseudomembranosa e atrófica, sendo a pseudomembranosa a mais comum, caracterizando-se como uma lesão do tipo branco-amarelada com formação de pseudomembrana esbranquiçada, a qual, quando removida por raspagem, resulta em uma base eritematosa (16). A ERP consiste em uma inflamação comum em pacientes diabéticos, oncológicos tratados por rádio ou quimioterapia, portadores do vírus HIV/SIDA e portadores de outros distúrbios imunológicos (17). Em comum nesses pacientes há o potencial de imunossupressão, onde quadros de infecções podem ser agravados devido baixa resistência do hospedeiro e à exacerbação da patogenicidade de espécies de *Candida* (17).

A invasão de *C. albicans* em hospedeiros saudáveis desencadeia uma rápida ação da resposta inflamatória do sistema imune humoral, seguida de respostas imunes específicas mediadas por células tipo linfócito T (imunidade celular) ou B (imunidade humoral) (18). O tecido epitelial apresenta grande importância na invasão dessa cepa, devido à capacidade de liberação, por suas células, de mediadores inflamatórios como interleucina 8 (IL-8) (11) e fator estimulador de células, que auxiliam na produção de histamina (GM-CSF)(19), ativando células linfóides que atuam no combate e destruição desses microrganismos (11). Em contrapartida à defesa do hospedeiro, os fatores de virulência desse fungo facilitam sua proliferação, principalmente em pacientes imunossuprimidos. Um desses fatores é a produção de, pelo menos, 10 exoenzimas, sendo oito excretadas para o meio extracelular, com destaque para fosfolipases e proteases (20). Com o objetivo de invasão tecidual, níveis aumentados de fosfolipases degradam os fosfolipídios da membrana plasmática das células do hospedeiro, permitindo a aderência da cepa fúngica à mucosa oral (21). Por sua vez, as proteases destroem o colágeno e a queratina presentes na mucosa, além de neutralizarem componentes imunológicos, tais como anticorpos e citocinas, dificultando a resposta imune na área (22,23). Juntamente com a produção de enzimas, a *C. albicans* também é capaz de produzir hifas através de seu dimorfismo objetivando invasão tecidual, utilizando adesina para a ligação às moléculas

de ferritidina presentes no epitélio do hospedeiro. Esta ligação permite a absorção de ferro, favorecendo o crescimento da cepa e provocando a evolução da infecção (24,25).

O edentulismo é um problema de saúde pública em diversos países, porém, sua taxa sofre grandes variações regionalmente. Em estudo contemplando 42 países, as taxas de edentulismo em idosos (>65 anos) de países em desenvolvimento variaram em torno de 1,3% (Nigéria) a 78% (Bósnia e Herzegovina); em países desenvolvidos, este índice foi de 16,3% (França) a 58% (Canadá) (26). Estima-se que 267 milhões de pessoas no mundo são edêntulos (27). As próteses dentárias totais são amplamente utilizadas em tratamentos reabilitadores desses pacientes, possibilitando um restabelecimento estético e funcional a um custo reduzido. No Brasil, no último levantamento disponível, mostrou-se que 76,5% da população com idades entre 65 e 74 anos fazem uso de próteses totais removíveis superiores (28). O levantamento indicou também uma média de 25,3 dentes perdidos nesta faixa etária e uma necessidade não atendida de 57,6% e 69,7% de próteses superiores e inferiores, respectivamente (28). Considerando o frequente uso deste tipo de aparelho protético e a incidência de diversas espécies de *Candida* spp em pessoas que vivem com HIV (PVH), torna-se importante considerar o risco da disbiose esses usuários, levando a quadros clínicos exacerbados dessa infecção.

Em levantamento bibliográfico, os temas mais discutidos sobre cepas de *Candida* spp foram sua resistência a antifúngicos tradicionais, especialmente fluconazol (29–33), tratamentos alternativos (34–36) análise do perfil de colonização (37–40), avaliação de fatores de virulência, incluído proteinase e fosfolipase (41–48), e associação da colonização com fatores predisponentes (49–51).

A análise da resistência antifúngica das cepas de *Candida* spp vem sendo realizada há anos, porém sua contínua análise é importante devido ao rápido desenvolvimento do mecanismo de defesa da cepa. Estudos apontam resistência a fluconazol em *Candida* spp. em índices de 40% (29), sendo a maioria das cepas resistentes não *albicans*(30), em especial cepas de *C. glabrata* e *Candida auris* (31). Apesar disso, *C. albicans* resistentes a fluconazol vem sendo isoladas em pacientes com HIV e candidíase oral (32,33). Assim, com o potencial surgimento de cepas ainda mais resistentes a tratamentos convencionais, a busca por alternativas tem demonstrado resultados promissores, como o uso de terapia fotodinâmica mediada por curcumina (34), bochechos com extrato aquoso de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) formulados para PVH (35), e uso de probióticos como *Lactobacillus* (36). Apesar dos correntes esforços, diagnósticos



de infecção por *Candida* spp. continuam frequentes nos consultórios odontológicos e médicos, especialmente em pacientes com algum tipo de comorbidade.

Assim como a sensibilidade a antifúngicos, o índice de colonização de cada espécie de *Candida* em pacientes com HIV foi avaliado em diversos cenários. Lam-Ubol *et al.* (37) em um hospital na Tailândia, detectou colonização por *C. albicans* em 64% dos pacientes, mesmo com o uso regular de TARV; e 34% dos pacientes sem o vírus HIV apresentaram a cepa. Em estudo de Clark-Ordonez *et al.* (38), 56,3% pacientes apresentaram colonização por *Candida* spp. e *C. albicans* foi a mais frequente (71,8%). Ribeiro *et al.* (39) analisaram 246 pacientes e demonstraram que espécies de *Candida* estavam presentes em 41,87% dos pacientes, sendo novamente *C. albicans* a mais frequente (32,52%). Em revisão de literatura, Patil *et al.* (40) verificaram que casos de candidíase orofaríngea em pacientes HIV variou entre 0,9 e 83%, na Índia de 5 a 38,8% e na África do Sul de 0,9 a 81,5%, sendo a *C. albicans* foi a cepa mais prevalente (37,2 a 95,2%).

Um fator importante a ser considerado é a análise da virulência em espécies de *Candida* isoladas de pacientes em diferentes condições de saúde, procurando contribuir para o entendimento da patogenia desta espécie. Em meta análise realizada por Orlandini *et al.* (41) foi verificado que a produção de fosfolipase apresentou maiores índices em pacientes infectados pelo vírus HIV, hemolisina também apresentou índices aumentados na maioria dos analisados, e os dados não demonstraram diferenças para produção de proteinase. Em estudo de Portela *et al.* (42) a capacidade de formação de biofilme de cepas de *C. albicans* entre pacientes portadores do vírus HIV não apresentou diferença quando comparado a pacientes sem infecção pelo vírus, a produção de fosfolipase foi mais frequente no grupo de pacientes HIV+ (40,5%), e este apresentava alta frequência de produção de protease (84,8%). Já em estudo de Menezes *et al.* (43) os resultados demonstram que todos os isolados de pacientes HIV+ apresentavam atividade hemolítica, 98% produção de fosfolipase, 82% proteinase e 32% para DNase; entre os pacientes sem o vírus, todos apresentavam atividade hemolítica, 90,2% produção de fosfolipase e proteinase, e 12,2% DNase.

Lahkar *et al.* (44) em estudo com pacientes sem uso do TARV demonstraram que espécies não-*albicans* foram as que mais produziram biofilme, *C. albicans* foi a espécie com maior produção de fosfolipase e proteinase, além da relação entre a baixa contagem de células T-CD4+ do paciente com o aumento da expressão de biofilme. Em dados obtidos por De Paula *et al.* (45), todas as cepas de *C. albicans* exibiram produção de fosfolipase e 36,8% de proteinase; adicionalmente, a maioria das amostras apresentaram propriedade hidrofóbica, fator importante

para a produção de biofilme. Hernandez *et al.* (46), avaliaram essas exoenzimas em pacientes com imunossupressão, incluindo diagnosticados com HIV, onde a atividade proteolítica foi identificada em 46% das cepas isoladas de pacientes oncológicos, 54% em pacientes HIV+, 60% em pacientes diabéticos, 70% em pacientes com sinais de candidíase oral e 42% em indivíduos saudáveis. Em estudo de Mane *et al.* (47), *C. albicans* apresentou produção de proteinase em 89,7% dos casos e fosfolipase em 59,0%; este índice em espécies não-*albicans* foi de 34,6% e 15,4% para proteinase e fosfolipase, respectivamente. Em estudo de Back-Brito *et al.* (48), o grupo de pacientes HIV apresentou alta atividade enzimática, sendo que 82% dos pacientes apresentavam alta produção de proteinase (48% no grupo sem HIV) e 70% alta produção de fosfolipase (62% no grupo sem HIV).

Procurando encontrar fatores associados à alta colonização de espécies de *Candida* em pacientes portadores do vírus HIV, estudos avaliaram possíveis fatores predisponentes à infecção. Du *et al.* (49) encontraram relação entre contagem de células T-CD4+ <200 cells/mm<sup>3</sup>, carga fúngica ≥300 CFU/mL e o aumento nos casos de manifestação clínica (p<0,001) nesses pacientes. Em estudo realizado no Irã (50), foi encontrada relação entre a colonização de *Candida* spp. com a contagem de T-CD4+ menor que <200 cells/mm<sup>3</sup>, histórico de compartilhamento de seringas e gênero, onde homens apresentaram maior frequência de isolamento de *C. albicans*. Por outro lado, Sah *et al.* (51) não encontraram relação estatisticamente entre a sorologia do paciente, contagem de T-CD4+ e infecção por espécies de *Candida*.

Considerando os fatores expostos, e que aproximadamente 30% da população mundial é colonizada por diferentes espécies de *Candida* spp., sendo *C. albicans* destaque quanto a incidência e prevalência em PVH, é de fundamental importância o controle de seu crescimento pelo sistema imune do hospedeiro e, quando necessário, pelo uso de fármacos (52). Apesar de excelentes estudos já realizados, características como a morfologia e virulência de *Candida* spp. em pacientes com potencial de imunossupressão, não foram totalmente esclarecidas e consistem em fatores importantes para o estabelecimento de tratamentos individualizados e eficazes. Desta forma, mostra-se necessário a elucidação desses fatores em PVH, especialmente em usuários de próteses totais com estomatite relacionada a prótese. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a prevalência, virulência e morfologia de cepas de *Candida* spp. isoladas de usuários de próteses totais com estomatite relacionado a prótese, com e sem o diagnóstico de HIV.



---

## 2. OBJETIVOS

---



## 2. OBJETIVOS:

### 2.1. OBJETIVO GERAL:

O objetivo geral foi avaliar a prevalência e virulência, *in vitro*, de cepas de *Candida* spp. isoladas de biofilmes de pacientes usuários de próteses totais removíveis com estomatite relacionado a prótese (ERP), com e sem o diagnóstico de HIV.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Os objetivos específicos, em ambos os grupos, foram:

- Quantificar a prevalência de espécies de *Candida* spp. isoladas do biofilme das próteses totais, por meio de identificação pelo método cromógeno e confirmação de isolados pela reação de cadeia da polimerase (PCR).
- Avaliar a carga microbiana das próteses por meio da mensuração de unidades formadora de colônias (UFC/mL).
- Mensurar os fatores de virulência das cepas isoladas de *Candida* spp., por meio da avaliação de:
  - Capacidade de formação de biofilme, por meio da mensuração de unidades formadoras de colônias (UFC/mL).
  - Metabolismo celular, por meio de metabolização do sal tetrazolio.
  - Produção de Proteinase e Fosfolipase, por meio de kit fluorimétrico.
  - Capacidade de formação de hifas, por meio indutor de hifas
- Avaliar a idade, grau de ERP, carga viral, e contagem de linfócitos por formulário e, para o grupo experimental, correlacionar os dados de formação do biofilme com os dados de ERP, de carga viral e de contagem de linfócitos T-CD4+; bem como da ERP com carga viral e contagem de linfócitos T-CD4+.



---

## 3. MATERIAL E METODOS

---

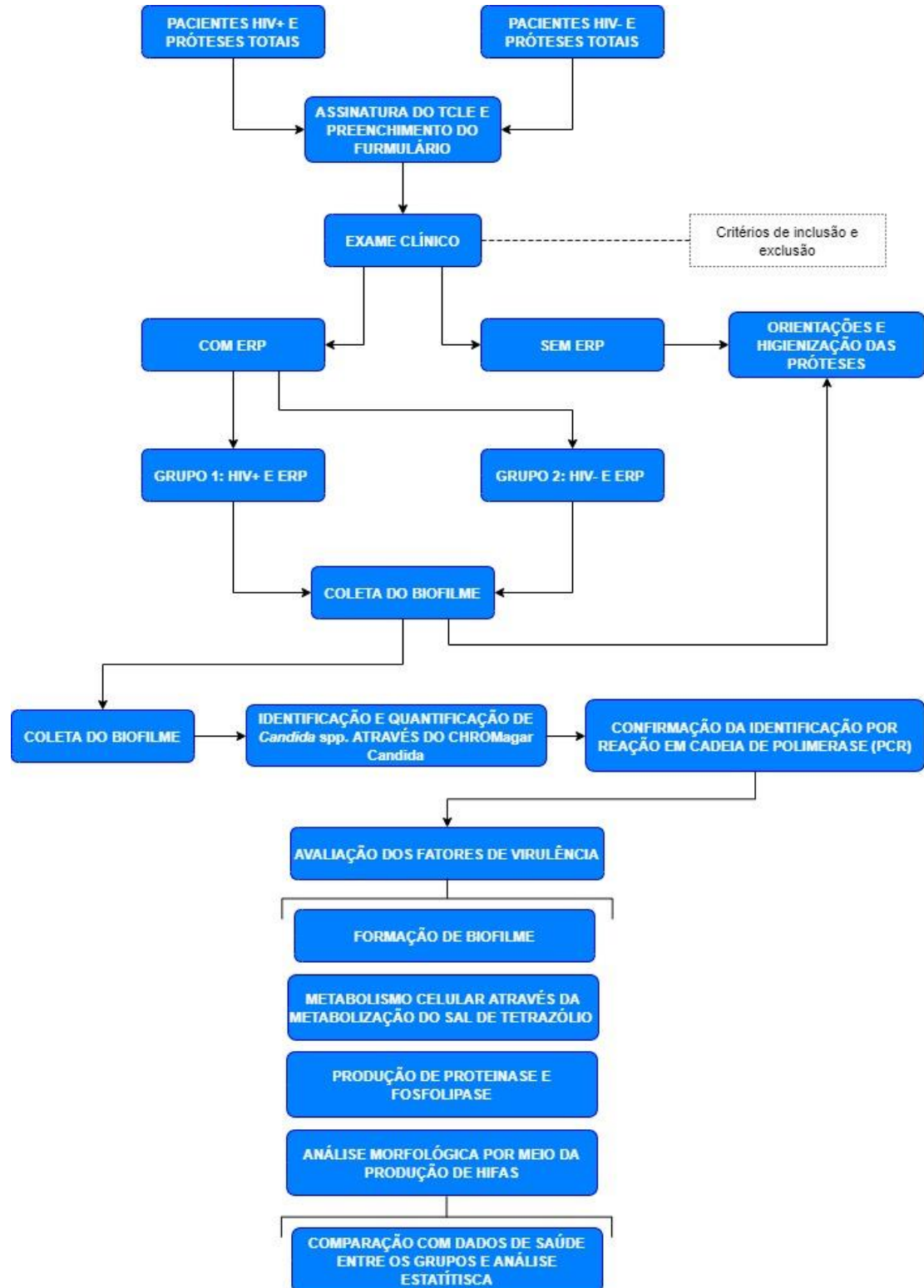




### 3. MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia foi desenvolvida de acordo com a figura 1.

Figura 1: Fluxograma de execução do material e métodos.



### 3.1. SELEÇÃO DA AMOSTRA

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP e do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – HCFMRP – USP (CAAE:17164619.0.1001.5419). O recrutamento foi realizado após compreensão do paciente a respeito da natureza do protocolo de pesquisa e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

A amostra consistiu em 55 pacientes usuários de próteses totais convencionais com estomatite relacionada a prótese (ERP), oriundos da enfermaria da Unidade Especial de Tratamento de Doenças Infecciosas do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (UETDI-HCRP-USP) e das clínicas de Prótese Total da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP).

Os pacientes foram distribuídos em dois grupos:

- I: Experimental: Pacientes que vivem com o vírus HIV;
- II: Controle: Pacientes sem diagnóstico de infecção pelo vírus HIV.

Foram adotados os seguintes critérios de inclusão:

- Idade superior a 18 anos
- Uso das próteses totais removíveis há mais de 1 ano
- Diagnóstico de ERP obedecendo a escala de Newton modificada(53), com classificação mínima IA.
- Uso de terapia antirretroviral (TARV) para o Grupo 1 (Experimental)

Como critérios de exclusão, foram definidos:

- Uso de antibióticos ou antifúngicos nos últimos 3 meses
- Contraindicação médica (pacientes em isolamento de contato)

A ERP foi diagnosticada de acordo com a escala de Newton modificada (53), sendo os diferentes graus classificados em:

- 0 (zero): Mucosa saudável;
- Tipo IA: Petéquias no tecido palatal normal, geralmente encontradas ao redor dos orifícios dos dutos das glândulas da mucosa do palato;
- Tipo IB: Áreas localizadas de inflamação da área recoberta pela prótese total;

- Tipo II: Área generalizada de inflamação envolvendo a área recoberta pela prótese;
- Tipo III: Superfície hiperplásica do palato com inflamação da área recoberta pela prótese.

### 3.2. DAS AMOSTRAS DE BIOFILME

O biofilme foi coletado por meio de método padronizado de ultrassonificação das próteses(24,54,55). Anteriormente à coleta, o paciente foi orientado a não se alimentar, não higienizar a cavidade oral ou ingerir bebidas por uma hora, de forma a minimizar os riscos de contaminação da amostra. As coletas foram realizadas de forma única em cada paciente, preferencialmente no período vespertino.

As próteses foram retiradas da cavidade oral, enxaguadas em água corrente por 10 segundos, inseridas em um recipiente plástico vedado (Ziploc, S.C. Johnson and Son, Racine, Wisconsin, U.S.) contendo 50 mL de tampão fosfato-salino (PBS). A seguir este primeiro recipiente foi inserido em um segundo recipiente plástico semelhante e disposto em cuba ultrassônica (Eppendorf, Cole Parmer 26373, 50/60 Hz, 1.3 Amp, Hamburgo, Alemanha) contendo água destilada, onde foi ultrassonificado por 10 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, a prótese foi retirada e o conteúdo obtido foi transferido para um tubo estéril, armazenado em gelo até o processamento laboratorial, realizado no período máximo de 3 horas.

Após as coletas, as próteses foram higienizadas com creme dental para próteses (Corega, GlaxoSmithKline, Londre, Reino Unido) e escova específica para próteses totais (Bitufo, Hypera Pharma, São Paulo, SP, Brasil) e devolvidas ao paciente, juntamente com orientações verbais e escritas de higienização das próteses e da cavidade oral.

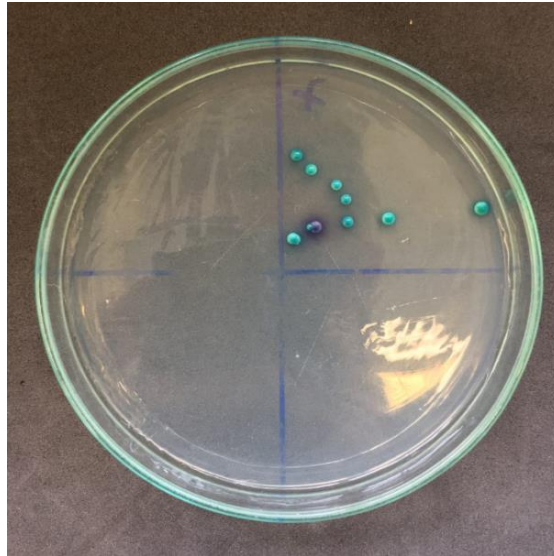
### 3.3. AVALIAÇÃO DE PREVALÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DE *Candida* spp.

#### 3.3.1. Identificação de *Candida* spp. por método cromógeno CHROMagar*Candida*<sup>TM</sup>

Um total de 25 µL da solução contendo o biofilme recuperado das próteses e suas diluições seriadas ( $10^0$  a  $10^{-3}$ ) foram semeadas separadamente em placas de Petri contendo CHROMagar*Candida*<sup>TM</sup> (Difco Laboratories Inc., Detroit, Michigan, EUA) e incubadas a

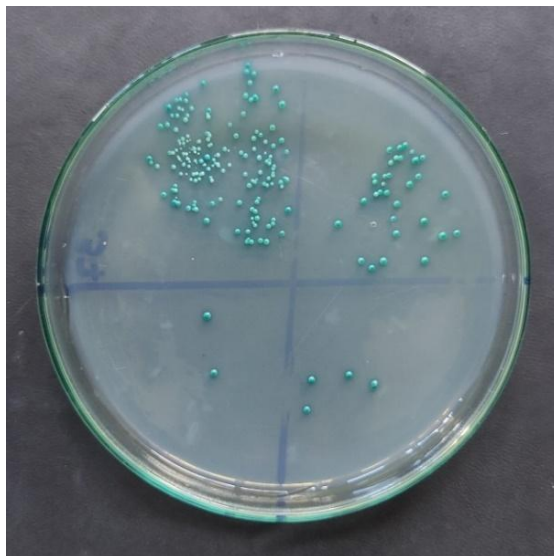
37°C por 48 horas. Este meio cromogênico identifica as espécies de *Candida* de acordo com diferentes cores de suas colônias após o tempo de incubação (Figuras 2 e 3). O teste vem sendo utilizado com comprovada eficácia para a identificação primária de isolados clínicos desta espécie em diversos estudos(56–58) .

Figura 2: Placa com CHROMagarCandida™ – Identificação de *Candida* spp. em  $10^0$



Fonte: autoria própria

Figura 3: Placa com CHROMagarCandida™ – Identificação de *Candida* spp. em  $10^0$  a  $10^{-3}$



Fonte: autoria própria

No espectro de cores após incubação, as colônias verdes representaram *C. albicans*; colônias azuis acinzentadas e azuis metalizadas, *C. tropicalis*; colônias cor malva, *C. glabrata*; colônias planas de grande dimensão, cor rosa clara a vermelho claro com entorno esbranquiçado: *C. krusei*; Colônias bege claro ou transparente: outras espécies de *Candida*.

### 3.3.2. Confirmação da identificação de *Candida* spp. por Reação de Cadeia da Polimerase (PCR)

A confirmação do isolamento de *Candida* spp. foi realizada por Reação de Cadeia da polimerase (PCR). Para tal, foi realizado a extração do DNA das amostras das cepas isoladas dos pacientes (Figura 4) e de cepas padrão de *Candida* spp. para comparação do polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição.

Figura 4: Amostras previamente à extração do DNA.



Fonte: autoria própria

Uma alíquota das cepas isoladas de pacientes e das cepas padrão foram semeadas em estrias múltiplas em placa de petri com ágar Sabouraud Dextrose (HiMediaLaboratoriesPvt. Ltda., Mumbai, Índia). Após 48 horas de crescimento, uma colônia foi transferida para um tubo de ensaio com 5 mL de caldo Sabouraud Dextrose (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda, Mumbai, Índia). Após incubação por 24 horas, os tubos foram submetidos à centrifugação por 5 minutos a 3200 g. O *pellet* resultante foi suspenso em 500 µL de tampão de lise associados à 500µL de pérolas de vidro, de 425-600µm de diâmetro, previamente lavadas com ácido clorídrico (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) (Figura 5). O tampão de lise foi composto por 200 mM

de Tris-HCl (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA); 250 mM de NaCl (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA); 25 mM de EDTA (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) e 0,5% de solução de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) (Figura 6).

Figura 5: Pérolas de vidro (425-600µm de diâmetro).



Fonte: autoria própria

Figura 6: Reagentes utilizados para composição do tampão de lise.

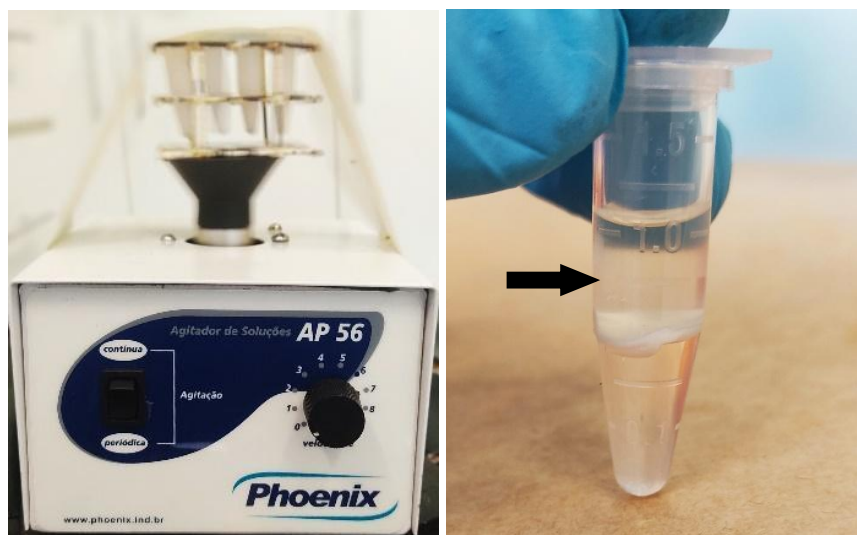


Fonte: autoria própria

As amostras foram homogeneizadas em agitador por 10 minutos (Figura 7). Todo o restante lisado foi transferido para um microtubo de 1,5mL com 500µL de fenol-clorofórmio (1:1) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA). Em seguida, os microtubos foram novamente agitados, por 10 minutos e centrifugados a 2000g por 10 min. A fase aquosa (Figura 8) obtida desta centrifugação foi transferida para um novo tubo de 1,5mL e a ela adicionado 1mL de isopropanol (Chemco Indústria e Comércio Ltda., Hortolândia, São Paulo, Brasil), para a precipitação do DNA, seguido de nova centrifugação. O *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol

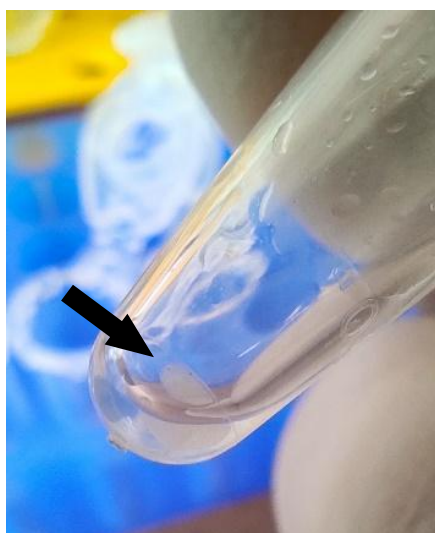
refrigerado em uma concentração de 70% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) e submetido à centrifugação por 5 minutos. O *pellet* obtido foi seco à temperatura ambiente (Figura 9).

Figura 7: Agitador de soluções. Figura 8: Indicação da fase aquosa (seta) da amostra após centrifugação.



Fonte: autoria própria

Figura 9: Indicação do *pellet* formado (seta), previamente à secagem.



Fonte: autoria própria

As amostras foram diluídas em 50  $\mu\text{L}$  de água ultrapura e submetidas a um tratamento com 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de RNase (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) em banho-maria à 37°C por 30 minutos (Figuras 10 e 11). Após o tratamento, 2  $\mu\text{L}$  de cada amostra foi quantificada em espectrofotômetro (BioSpec-mini, Shimadzu Biotech, Nagaokakyo, Quioto, Japão) (Figura 12).



Figura 10: Aparelho de banho maria. Figura 11: Amostras em posição.



Fonte: autoria própria

Figura 12: Espectrofotômetro.



Fonte: autoria própria

A medida da absorbância foi realizada em 260nm e 280nm e a razão 260/280 determinou a pureza da amostra. A integridade do DNA foi avaliada por meio da aplicação das amostras em gel de agarose (Agargen, Laboratorios Espanagar, Torrejon de Ardoz, Madri, Espanha) (Figuras 13 e 14). Após a confirmação da integridade, as amostras foram estocadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  previamente ao teste.

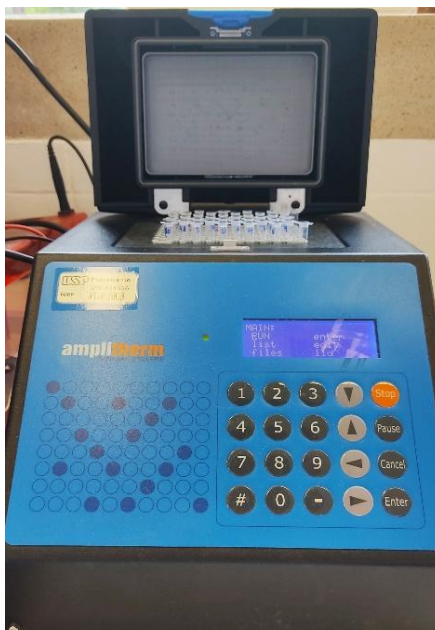
Figura 13: Aparelho de eletroforese. Figura 14: Cuba com gel de agarose em posição.



Fonte: autoria própria

A confirmação das colônias de *Candida* spp. foi realizada após a seleção de colônias seguindo sua cor da identificação no CHROMagar *Candida*. A reação de PCR foi conduzida pela amplificação do IGS2 e restrição com a enzima NlaIII IGS2 para *C. albicans* e amplificação através de IGS com restrição pela enzima AluI para outras espécies de *Candida*, através de primers descritos por Cornet et al.(59). O polimorfismo das sequências após o tratamento com a enzima de restrição, vistos em gel de agarose, além da eficácia científica do teste CHROMagar*Candida*<sup>TM</sup>, definiram a confirmação da cepa. Foi utilizado os primers para a amplificação parcial do IGS (IGS2):5'-TTAACTACAGTTGATCGGAC-3' (*forward*) e 5'-CTTAATCTTTGAGACAAGC-3' (*reverse*) para *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*. Outro par de primers (Sigma-aldrich) de amplificação total do IGS 5'-CGATCTGCTGAGATTAAG-3' (*forward*) E 5'-CTTAATCTTTGAGACAAGC-3' (*reverse*) foi selecionado para a espécie *C. parapsilosis*. Para amplificação foi utilizado um mix contendo 10 pmol de cada *primer (forward reverse)*, 5nmol de dNTP (Qiagen, Hilden, Renânia do Norte-Vestfália, Alemanha), 1,5U Taqpolymerase (Sigma-Aldrich), 10% de tampão da Taqpolymerase (Sigma-Aldrich), e 50ng de DNA, em um volume final de 25µL, que foi submetido à ciclagem térmica com desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguida por 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 48°C, 2 minutos e 30 segundos a 72°C e uma ciclagem final de 5 minutos a 72°C (Figura 15).

Figura 15: Aparelho termo circulador com amostras em posição.



Fonte: autoria própria

Após a amplificação, uma alíquota de 5  $\mu$ L do produto do PCR foi confirmada em gel de agarose a 0,8% a 100 V por 40 minutos. O produto do PCR confirmado foi submetido à digestão por meio de enzimas de restrição, com o objetivo de obtermos o polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição necessários para a identificação das espécies de *Candida*. Para isso, foi selecionada a enzima NlaIII (New England BioLabs, Hitchin, Hertfordshire, Inglaterra) para o IGS2 ou a enzima AluI (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, EUA) para IGS.

Para a reação de digestão foi utilizado 10  $\mu$ L de produto de PCR, 1,5 U de uma das enzimas, e 2  $\mu$ L do tampão em volume final de 20  $\mu$ L. A mistura foi levada ao termociclador por 90 minutos a 37°C, seguido de inativação da enzima por 20 minutos a 65°C. Os subfragmentos de DNA foram separados em gel de agarose 1% a 80V por 80 minutos, para verificar a separação das bandas (Figuras 13 e 14). Cada matriz de gel conteve amostras de todas as cepas de referência. A análise de cada matriz de gel foi realizada por meio de comparação visual dos padrões de bandas das cepas que foram identificadas com as cepas de referência.

### **3.3.3 Avaliação da carga microbiana por meio da mensuração de unidades formadora de colônias (UFC/mL)**

Concomitantemente à identificação por meio do CHROMagar*Candida*<sup>TM</sup>, foi realizada a contagem do crescimento do biofilme em baseline. As amostras e suas diluições ( $10^0$  a  $10^{-3}$ ), após incubação a  $37^\circ\text{C}$  por 48 horas, foram analisadas e as colônias formadas foram contadas e submetidas à seguinte fórmula:  $UFC/mL: \frac{n^\circ \text{ de colônias} \times 10^n}{q}$  [n: valor absoluto da diluição (0, 1, 2 ou 3); q: quantidade (mL) pipetada para cada diluição quando da semeadura (0,025 mL)].

### **3.4. AVALIAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DAS CEPAS DE ISOLADOS DE *Candida* spp.**

#### **3.4.1. Avaliação da capacidade de formação de biofilme por meio da mensuração de unidades formadoras de colônias (UFC/mL).**

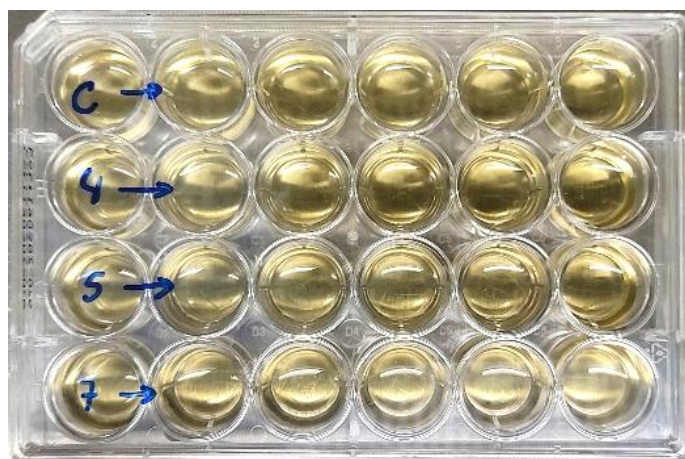
Para a formação de biofilme foi utilizado o protocolo descrito por Gulati *et al.*(60). Inicialmente, as cepas foram descongeladas e reativadas em ágar Sabouraud Dextrose, com armazenamento em estufa bacteriológica a  $37^\circ\text{C}$ , durante 48 horas. Em seguida, uma alçada foi transferida para o caldo Sabouraud Dextrose (SDB) e incubada a  $37^\circ\text{C}$  por 18 horas. Para padronização dos inóculos, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm (centrífuga 5430R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) por 5 minutos, lavadas e diluídas em PBS. A contagem da suspensão microbiana foi obtida em câmara de Neubauer (HBG, Berlim, Alemanha) (Figura 16). Em seguida, o meio de cultura foi inoculado a uma concentração de  $1 \times 10^6$  células/ mL. Asepticamente, em câmara de fluxo laminar (Pachane, Pa 400-ECO, Piracicaba, São Paulo, Brasil), as amostras foram distribuídas em placas de 24 poços (Techno PlasticProducts, Trasadingen, Suíça) (Figura 17). O grupo controle negativo, recebeu meio de cultura estéril.

Figura 16: Câmara de Neubauer.



Fonte: autoria própria

Figura 17: Amostras distribuídas em placa de 24 poços.



Fonte: autoria própria

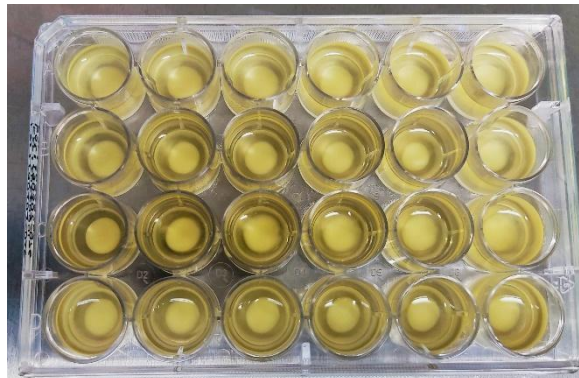
As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas sob agitação de 75 rpm em estufa microbiológica (Incubadora Shaker, Mod. CE-320, CienLab, Campinas, SP, Brasil) para aderência dos microrganismos. Em seguida, o meio de cultura foi removido e cada poço foi lavado com 1 mL de PBS para remoção dos microrganismos não aderidos. Em seguida, 1 mL de meio de cultura estéril foram novamente inseridos em cada poço e as placas foram incubadas a 37°C sob agitação de 75 rpm por mais 24 horas (Figura 18). Decorrido o período de incubação, o sobrenadante foi descartado e o biofilme foi lavado com 1 mL de PBS a fim de remover as células plantônicas (Figura 19). O biofilme foi removido por meio de sucessivas pipetagens utilizando 200  $\mu$ L de PBS e diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  foram semeadas em placas de Petri contendo Ágar Sabourand Dextrose. Após incubação a 37°C por 48 horas, foi determinado o número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL), considerando a seguinte fórmula:  $UFC/mL: \frac{n^{\circ} \text{ de colônias} \times 10^9}{q}$  [n: valor absoluto da diluição (0, 1, 2 ou 3); q: quantidade (mL) pipetada para cada diluição quando da semeadura (0,025 mL)]. A análise foi realizada em triplicata.

Figura 18: Incubadora Shaker.



Fonte: autoria própria

Figura 19: Amostras após incubação, com biofilme formado no fundo dos poços.



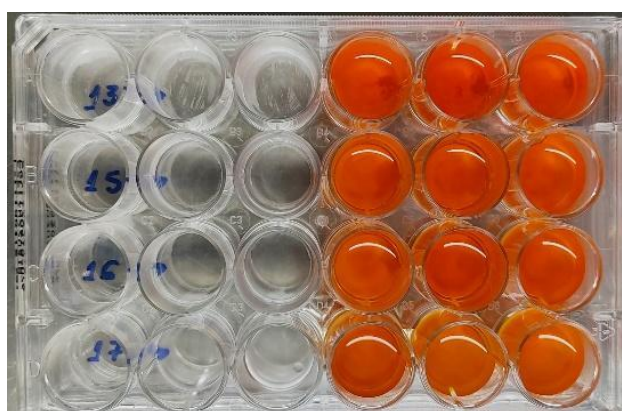
Fonte: autoria própria

### 3.4.2. Avaliação do metabolismo celular por meio de metabolização do sal tetrazolio.

A avaliação do metabolismo celular das amostras isoladas foi realizada por meio de metabolização do sal tetrazolio. Foi formado biofilme com as colônias isoladas em placa de poliestireno de 24 poços. Para isso, foram preparadas suspensões contendo  $1 \times 10^6$  células de leveduras por mL de meio de cultura RPMI 1640 suplementado com L-glutamina e tamponado com 0,165M de MOPS (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA).

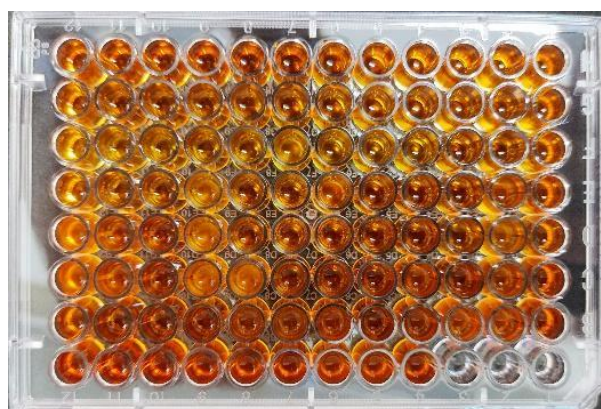
A atividade metabólica foi avaliada por ensaio XTT [2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfonil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida], que baseia-se na habilidade das enzimas desidrogenases mitocondriais de converterem o sal tetrazólio hidrossolúvel XTT (amarelo) em um produto solúvel em água (laranja). O XTT à 1mg/ mL em PBS foi diluído, na razão 20:1 em solução de menadiona (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA), 0,4 mM em acetona (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA). As placas foram incubadas à 37° em ambiente escuro por 2h e a leitura obtida à 492nm (Figura 20). Após a incubação, 100 µl do sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços (Figura 21).

Figura 20: Amostras após incubação com sal de tetrazolio.



Fonte: autoria própria

Figura 21: Amostras distribuídas para leitura de absorbância



Fonte: autoria própria

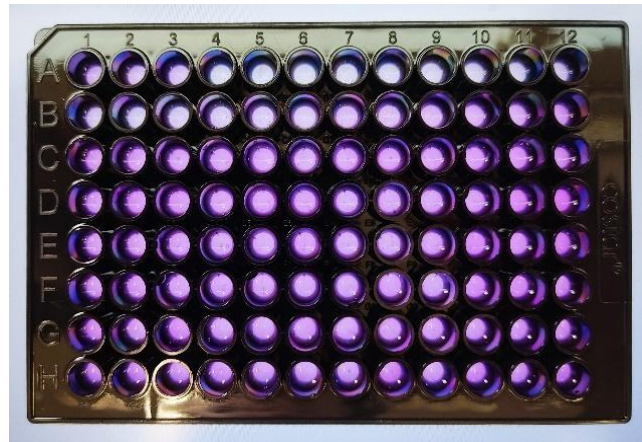
### 3.4.3. Avaliação da produção de proteinase e fosfolipase

Inicialmente, o meio de cultura Saboraud Dextrose (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda., Mumbai, India) foi inoculado com uma concentração de  $1.10^6$  cél/ mL das amostras de *Candida* spp. e incubados à 37°C por 48 horas. Após esse período, 1 mL de suspensão celular foi transferido para microtubos e centrifugados à 6000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a análise da produção de protease e o resíduo sólido para a análise da produção da fosfolipase.

A quantificação da proteinase foi realizada através de kit fluorimétrico EnzChek® Protease Assay (Molecular Probe E6638, Eugene, Oregon, EUA). Em uma placa de 96 poços foram adicionados 100 µL do sobrenadante e 100µL da solução caseína BODIPY diluída 20 vezes em tampão de digestão (Figura 22). A placa foi incubada à 37°C em estufa por 24 horas em área protegida da luz. A leitura da fluorescência foi realizada em leitor de microplaca (Figura 23), com excitação de 485 nm e emissão em 538 nm. Juntamente foi realizada curva padrão para a determinação enzimática. Para a avaliação da produção de fosfolipase o material sólido obtido por centrifugação foi ressuspensionado em tampão de lise (2M TrisHCl, 1 M CaCl<sub>2</sub> e água ultrapura em pH7,4) e posteriormente levado à agitação por 20 segundos e novamente centrifugado por 5 minutos à 10000 rpm. A avaliação da produção de fosfolipase foi realizada por meio do kit fluorimétrico AmplexRed® Phosphatidylcholine-Specific Phospholipase C Assay (Molecular Probe, Eugene, Oregon, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Para isto, 100 µL de solução, contendo 2% de AmplexRed (20mM), 1% de Horseradish Peroxidase, 2% de Alkaline Phosphatase, 1% de Choline Oxidase, 0,78% de Lecitina e 93,2% de tampão de digestão, foram adicionadas à 100 µL do lisado em cada poço de placa de 96 poços (Figura 24). A placa foi mantida à 37°C em estufa por 24 horas em região protegida de luz. A leitura da fluorescência foi realizada em leitor de microplacas (Figura 23) com excitação em 544nm e emissão em 590nm. Os valores obtidos foram comparados com os valores de fluorescência dos controles positivos fornecidos pelo fabricante.



Figura 22: Amostras incubadas previamente à leitura da fosfolipase



Fonte: autoria própria

Figura 23: Amostras incubadas previamente à leitura da proteinase



Fonte: autoria própria

Figura 24: Amostras incubadas previamente à leitura da proteinase



Fonte: autoria própria

#### 3.4.4. Avaliação da capacidade de formação de hifas

Um volume de  $3 \cdot 10^6$  células/mL foi transferido para 5 mL de meio indutor de hifas (meio 199; LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) acrescido de 10% de soro fetal bovino (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) (Figura 25). Após incubação a  $37^\circ\text{C}$  por 3 horas sob agitação de 80rpm foi procedido a contagem de leveduras e hifas em câmara de Neubauer (Figura 16) com objetiva de 10x a 40x em microscópio óptico binocular (Figura 26). A contagem das hifas foi realizada nos quatro maiores quadrantes da câmara e a média foi multiplicada pela diluição e fator de correção inerente ao método para unidade em MI. A fórmula utilizada para o cálculo foi:  $\text{Hifas/ml} = S/4 \times D \times 10^4$ , onde S é a soma dos quatro maiores quadrantes da câmara e D diluição utilizada para a contagem (10x).

Figura 25: Meio indutor de hifas. Figura 26: Microscópio óptico binocular Biofocus™



Fonte: autoria própria

### 3.5. AVALIAÇÃO DA IDADE, GRAU DE ERP, CARGA VIRAL E CONTAGEM DE LINFÓCITOS TCD4+

Para a avaliação foi empregado um formulário eletrônico, o qual foi preenchido pelo pesquisador concomitantemente com o exame clínico e a coleta de biofilme. Foram registrados nome, local do atendimento (UETDI-HCRP-USP ou FORP-USP), idade, grau de ERP, e, para GI, resultados do exame de carga viral e contagem de linfócitos T-CD4+. Os dados do grau de ERP foram analisados segundo a sua frequência e, juntamente com os resultados da formação do biofilme, foram correlacionados com a carga viral e contagem de linfócitos T-CD4+. Somente o pesquisador teve acesso às respostas coletadas.

### 3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O conjunto de dados foi avaliado quanto à distribuição de normalidade (Teste de Shapiro-Wilk) e homoscedasticidade (Teste de Levene). Os resultados mostraram que apenas fosfolipase para *C. albicans* e proteinase para espécies não-albicans apresentaram distribuição não normal, sendo os grupos (GI e GII) comparados por meio do teste U de Mann-Whitney. Para as demais variáveis, os dados apresentaram distribuição normal e homogênea, sendo os grupos (GI e GII) comparados pelo teste t de Student. Na avaliação da idade, grau de ERP, carga viral e contagem de linfócitos T-CD4+, a correlação entre a contagem do biofilme em UFC com a carga viral e CD4+ foi avaliada por meio do teste de Spearman, e a relação entre ERP e carga viral e CD4+ foi realizada por meio do teste exato de Fisher.

O teste exato de Fisher foi realizado no programa R, versão 3.5.1 (The R Foundation for Statistical Computing) e os demais testes foram realizados no IBM SPSS Statistics for Windows, versão 21.0 (IBM Corp, Armonk, NY, EUA). Foi utilizado nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ).

---

## 4. RESULTADOS

---

#### 4.1. DADOS AMOSTRAIS

Os dados referentes à amostra estudada estão apresentados na tabela 1. Um total de 242 pacientes (102 do GI e 140 GII) foram analisados para a participação no estudo. Destes, 72 apresentavam estomatite protética, porém 17 destes não passaram pelos critérios de inclusão da análise, totalizando então a amostra de 55 pacientes, sendo 33 do GI e 22 do GII. Os grupos foram compostos por idosos, sendo a idade mínima encontrada de 55 anos e a máxima de 90 anos com 32 mulheres e 23 homens.

Tabela 1: Dados dos pacientes que compuseram os grupos GI (+) e GII (-)

N	Gênero	Grupo	Idade	N	Gênero	Grupo	Idade
<b>1</b>	Feminino	+	67	<b>29</b>	Masculino	-	59
<b>2</b>	Feminino	+	81	<b>30</b>	Feminino	-	83
<b>3</b>	Feminino	+	73	<b>31</b>	Feminino	-	59
<b>4</b>	Masculino	+	69	<b>32</b>	Feminino	-	70
<b>5</b>	Feminino	+	88	<b>33</b>	Feminino	-	71
<b>6</b>	Masculino	+	74	<b>34</b>	Feminino	-	67
<b>7</b>	Feminino	+	61	<b>35</b>	Masculino	+	69
<b>8</b>	Masculino	-	72	<b>36</b>	Masculino	-	73
<b>9</b>	Feminino	+	55	<b>37</b>	Feminino	+	69
<b>10</b>	Feminino	+	56	<b>38</b>	Feminino	-	83
<b>11</b>	Masculino	+	68	<b>39</b>	Feminino	-	64
<b>12</b>	Feminino	-	72	<b>40</b>	Masculino	-	68
<b>13</b>	Masculino	-	71	<b>41</b>	Feminino	-	72
<b>14</b>	Masculino	-	78	<b>42</b>	Masculino	-	67
<b>15</b>	Feminino	-	69	<b>43</b>	Masculino	-	69
<b>16</b>	Masculino	-	68	<b>44</b>	Feminino	-	71

<b>17</b>	Feminino	-	73	<b>45</b>	Feminino	-	88
<b>18</b>	Masculino	-	61	<b>46</b>	Masculino	-	59
<b>19</b>	Feminino	-	65	<b>47</b>	Feminino	-	80
<b>20</b>	Feminino	-	72	<b>48</b>	Masculino	-	80
<b>21</b>	Masculino	+	68	<b>49</b>	Feminino	+	71
<b>22</b>	Masculino	+	70	<b>50</b>	Masculino	+	56
<b>23</b>	Feminino	-	66	<b>51</b>	Feminino	+	65
<b>24</b>	Feminino	-	70	<b>52</b>	Masculino	-	62
<b>25</b>	Masculino	+	67	<b>53</b>	Masculino	+	67
<b>26</b>	Feminino	-	71	<b>54</b>	Feminino	+	81
<b>27</b>	Feminino	-	65	<b>55</b>	Feminino	+	69
<b>28</b>	Masculino	+	63				

---

#### **4.2. IDENTIFICAÇÃO DE *Candida* spp. POR MÉTODO CROMÓGENO CHROMAGAR<sup>TM</sup> *Candida* E CONFIRMAÇÃO POR PCR.**

Foram realizadas um total de 55 coletas de biofilme de próteses totais, sendo 33 pacientes do controle e 22 do grupo experimental. A idade média dos pacientes do grupo controle foi de 70,14 anos (SD± 6,62) e do experimental de 68,77 (SD± 9,66). Em um total de 63 espécies de *Candida* isoladas (Fig. 27), 31 foram no grupo controle (média de 0,93 cepas isoladas por paciente – Fig. 4) e 32 no experimental (média de 1,45 cepas por paciente – Fig.28). As amostras foram identificadas primariamente pelo método cromógeno e posteriormente confirmadas através do teste de PRC, por meio da comparação das bandas obtidas em gel de agarose (Figura 29). Os resultados detalhados podem ser encontrados na tabela A1 (Apêndice A)

Figura 27: Demonstração da distribuição total de frequência de isolamento de *Candida* spp.

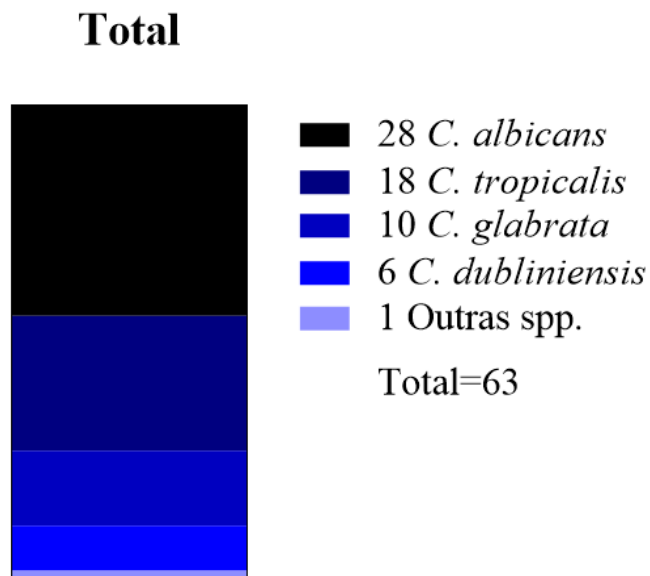
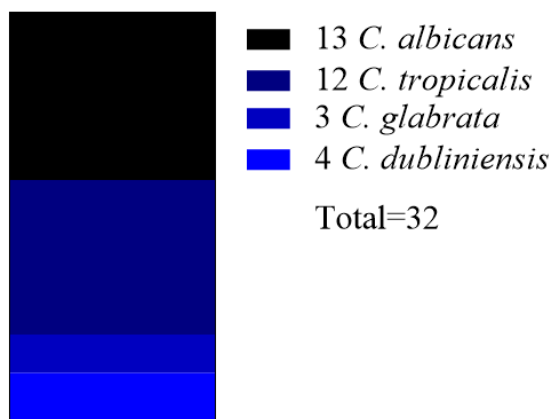


Figura 28: Demonstração da distribuição de frequência de isolamento de *Candida* spp. por grupo.

**EXPERIMENTAL**



**CONTROLE**

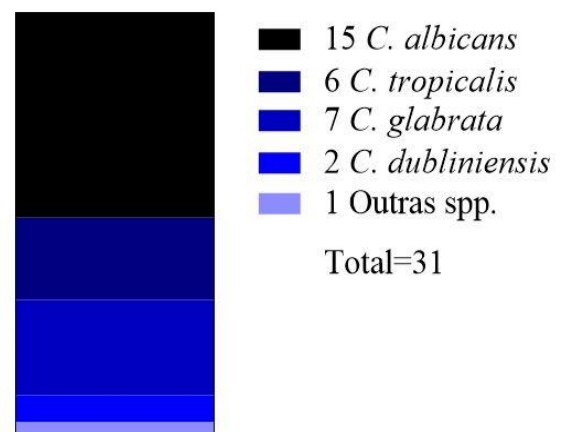
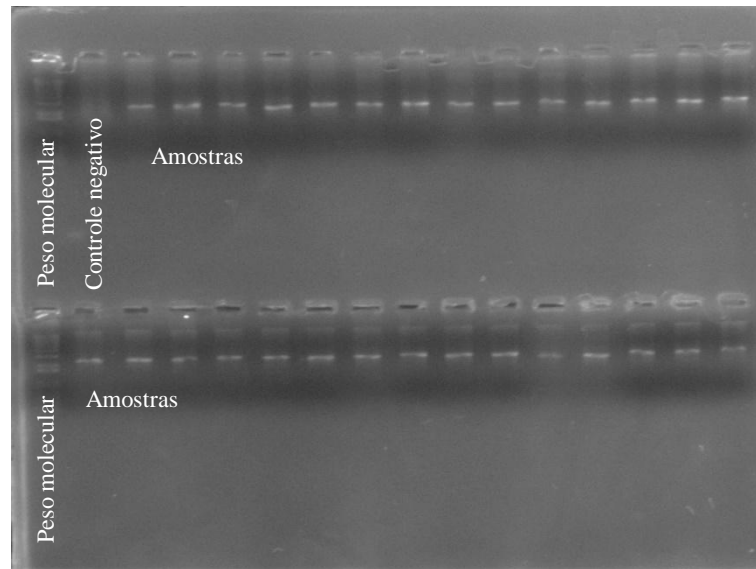




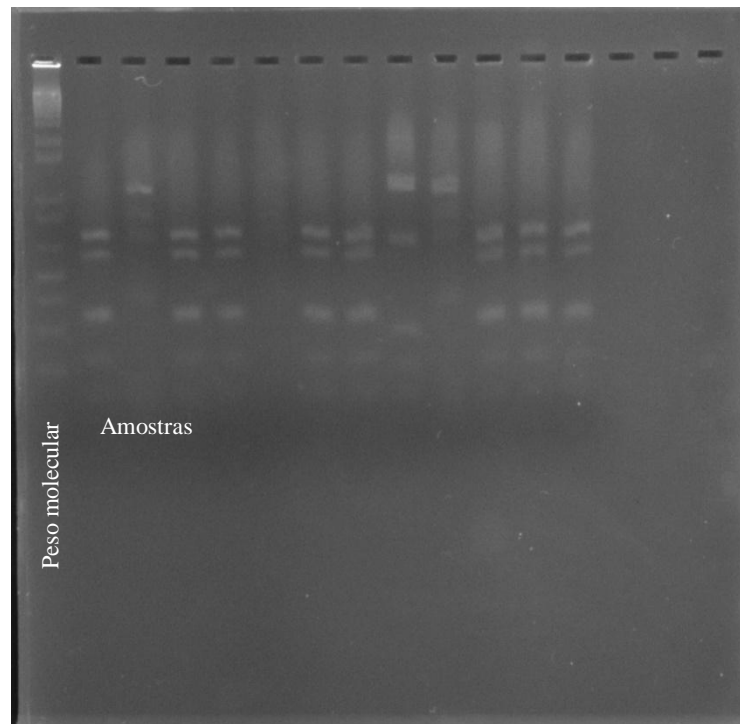
Figura 29: Representação dos resultados da amplificação do gene *IGS* e *IGS2* de *Candida* spp. previamente a restrição com enzimas



Fonte: autoria própria

Na Figura 29 são observados os resultados da amplificação do gene *IGS* e *IGS2*, previamente à digestão com enzimas de restrição. Já na Figura 30 são visualizadas as amostras posteriormente ao período de incubação em eletroforese para a restrição, onde é possível notar uma solução com peso molecular na primeira coluna do gel, seguida por cepas de *C. albicans* e não-*albicans*, exibindo bandas que foram utilizadas para comparação visual dos padrões das cepas identificadas com as cepas de referência.

Figura 30: Representação do teste de PCR com bandas de identificação de espécies não-albicans em gel de agarose após incubação em eletroforese.

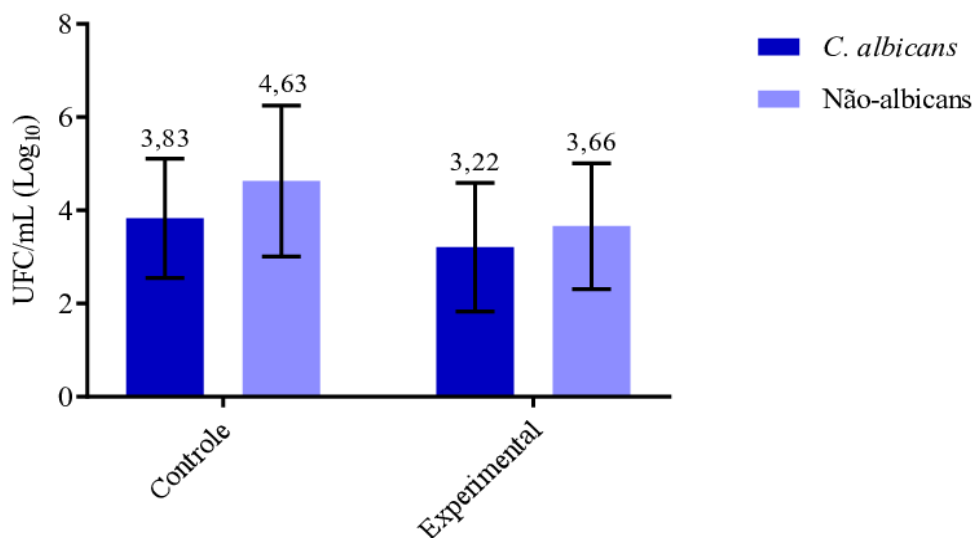


Fonte: autoria própria

#### 4.3. AVALIAÇÃO DA CARGA MICROBIANA POR MEIO DA MENSURAÇÃO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (UFC/mL)

Os resultados da carga microbiana do biofilme (contagem de unidades formadoras de colônia - UFC) no momento da identificação das cepas estão apresentados na figura 31. Apesar da diferença numérica, não foi encontrada diferença significativa entre ambos os grupos (experimental e controle) tanto para *C. albicans* ( $p=0,238$ ), como para não-albicans ( $p=0,095$ ) (Teste T Student;  $\alpha = 0,05$ ). Os resultados detalhados podem ser analisados na tabela A2 (Apêndice A)

Figura 31: Média da contagem de UFC/MI (Log<sub>10</sub>) de cepas de *C. albicans* e não-albicans em baseline - Grupos experimental e controle.



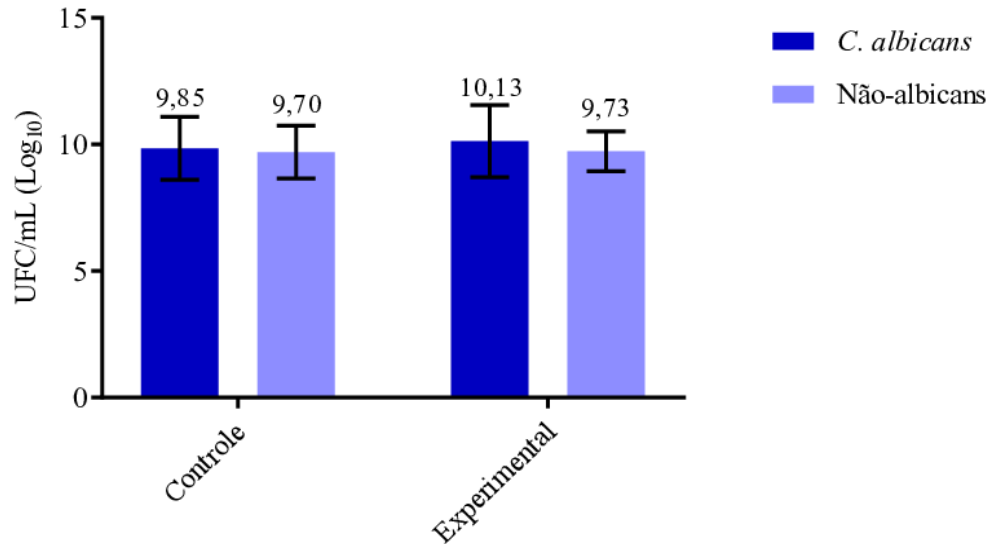
#### 4.4. AVALIAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DAS CEPAS DE ISOLADOS DE *Candida* spp.

##### 4.4.1. CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME POR MEIO DA MENSURAÇÃO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (UFC/ML).

Os resultados da avaliação da capacidade de produção de biofilme estão ilustrados na figura 32.

Foi observada pequena variação entre ambos os grupos (experimental e controle), com resultados próximos para cepas não-albicans e discreto aumento para *C. albicans* no grupo experimental. Porém, não foram encontradas diferenças significativas entre ambos os grupos (experimental e controle) na produção de biofilme tanto para *C. albicans* ( $p=0,578$ ), como não-albicans ( $p=0,953$ ) (Figura 32/ Apêndice A2).

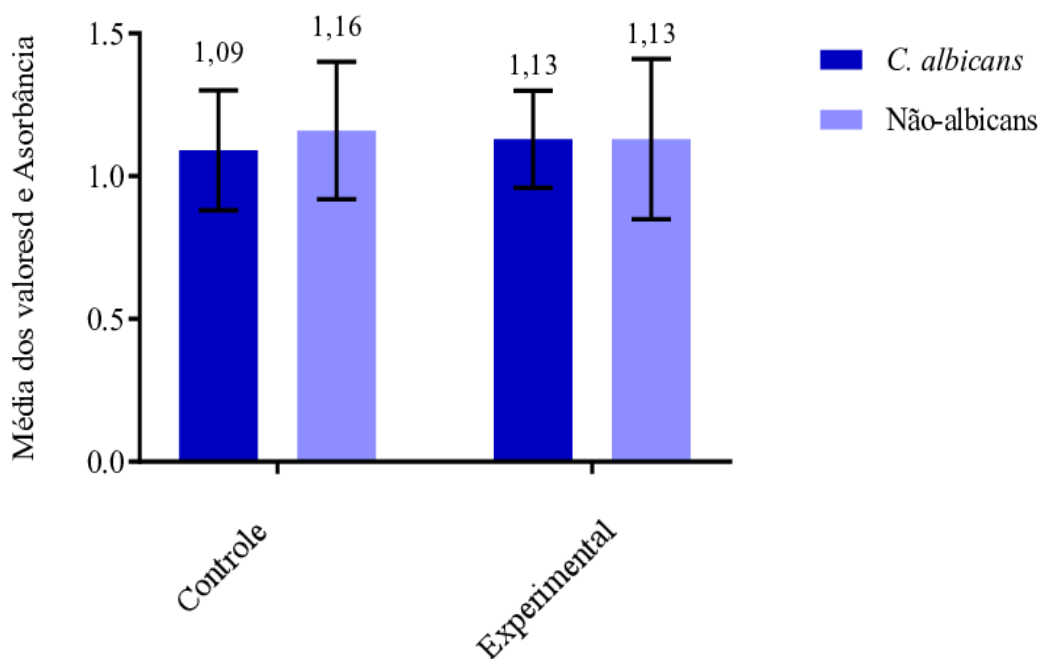
Figura 32: Média da contagem de UFC/mL ( $\text{Log}_{10}$ ) de cepas de *C. albicans* e não-albicans – Grupos experimental e controle.



#### 4.4.2. AVALIAÇÃO DO METABOLISMO CELULAR POR MEIO DE METABOLIZAÇÃO DO SAL TETRAZOLIO.

Avaliando o metabolismo celular das cepas dos grupos amostrais, foram obtidos resultados parecidos para os diferentes grupos de pacientes e de cepas. A análise estatística não encontrou diferenças quando considerando a sorologia dos pacientes tanto para o grupo de *C. albicans* ( $p=0,547$ ) quanto para não-albicans ( $p= 0,792$ ) (Fig. 33). Os dados detalhados podem ser analisados na tabela A3 (apêndice A)

Figura 33: Média dos valores de absorvância de cepas de *C. albicans* e não-*albicans* – Grupos experimental e controle.



#### 4.4.3. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PROTEINASE E FOSFOLIPASE

A produção de exoenzimas é uma característica de virulência conhecida em diversas espécies de *Candida*. Os resultados da análise estatística demonstraram que não houve diferença entre a produção de fosfolipase nos dois grupos de pacientes (controle e experimental) nas amostras de *C. albicans* ( $p=0,786$ ) e não-*albicans* ( $p=0,588$ ). Na análise foi incluso também comparação entre *C. tropicalis*, isoladamente, devido ao número de cepas da espécie obtidas no estudo, porém não foram apontadas diferentes da produção de fosfolipase nos dois grupos de pacientes (0,985).

Já na análise de proteinase, foi encontrada diferença significativa entre o grupo controle e experimental para *C. albicans* ( $p=0,031$ ), com maiores valores para pacientes controle. Foram encontradas diferenças também entre não-*albicans*, com maiores valores no grupo experimental ( $p=0,016$ ). Os resultados da avaliação da produção de proteinase e fosfolipase podem ser analisados na Tabela 2. Os dados completos da análise de produção de proteinase e fosfolipase estão disponíveis na tabela A4 (Apêndice A)

Tabela 2: Médias da produção de fosfolipase (em mU) e proteinase (fluorescência) dos grupos de cepas no grupo experimental e controle.

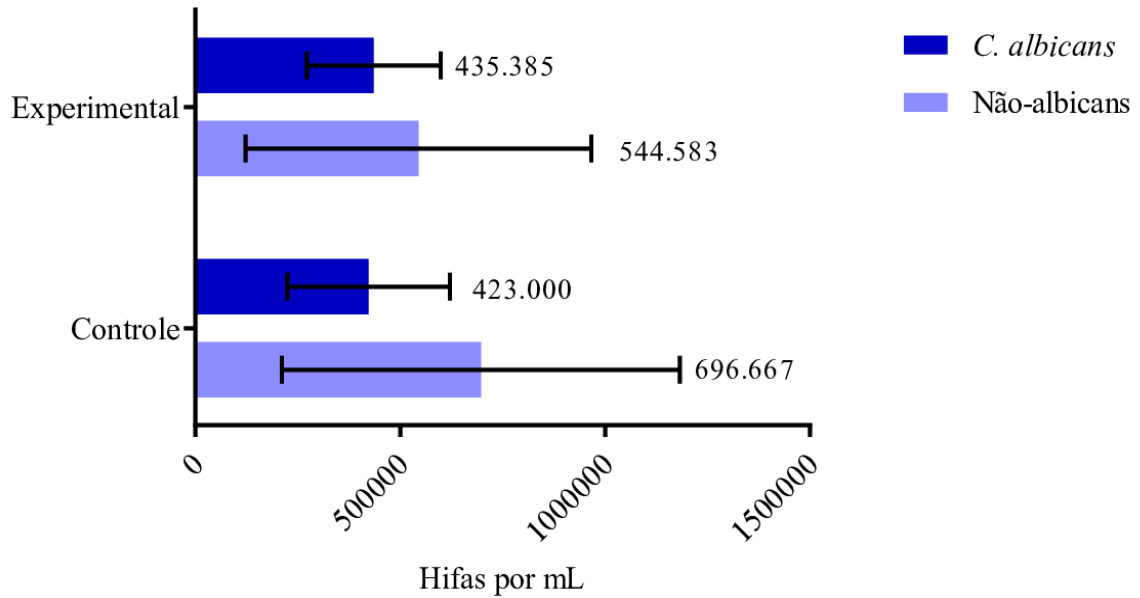
	Espécie	Grupo	Média (SD)	Mínimo	Máximo	(p)
Fosfolipase	<i>C. albicans</i>	Controle	125,98 (9,36)	115,70	146,18	0,786**
		Experimental	124,74 (5,27)	117,31	136,36	
	<i>C. tropicalis</i>	Controle	131,75 (9,40)	123,25	145,36	0,985*
		Experimental	131,88 (15,26)	108,26	159,22	
	Não-albicans	Controle	126,58 (8,43)	115,07	145,36	0,588*
		Experimental	123,75 (16,15)	84,17	142,36	
Proteinase	<i>C. albicans</i>	Controle	52465 (24537)	20909	100581	0,031*
		Experimental	34725 (14608)	16298	61896	
	<i>C. tropicalis</i>	Controle	95924 (47474)	29333	169877	0,224*
		Experimental	73086 (29501)	32175	120640	
	Não-albicans	Controle	26133 (41573)	0	169877	0,016**
		Experimental	50217 (41287)	0	120640	

\* Teste T de student; \*\* Teste U de Mann Whitney.

#### 4.4.4. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE HIFAS

Na avaliação de produção de Hifas, foram desconsideradas cepas de *Candida glabrata*, devido à ausência de capacidade de dimorfismo nesta espécie. Avaliando a figura 34, foi possível verificar uma maior produção de hifas em espécies não-albicans em ambos os grupos (experimental e controle). Não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos, tanto para *C. albicans* ( $p=0,860$ ), como para não-albicans ( $p=0,501$ ). Os dados por amostra estão disponíveis na tabela A5 (Apêndice A)

Figura 34: Média dos valores de produção de hifas de cepas de *C. albicans* e não-albicans - Grupos experimental e controle.



A contagem das hifas, realizada através de microscopia óptica, identificou fenotipicamente as estruturas, onde hifas foram caracterizadas como estruturas alongadas (Figuras 35 e 36), e leveduras como estruturas circulares e sem prolongamento citoplasmático (Figura 37).

Figura 35: Hifa formada (ao centro) após período de incubação em meio indutor de hifas.



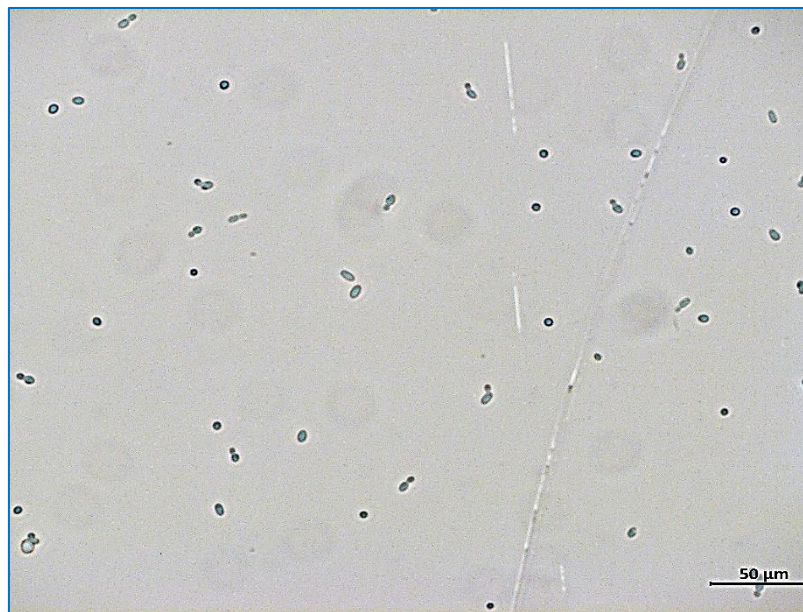
Fonte: autoria própria

Figura 36: Hifas e leveduras após período de incubação em meio indutor de hifas.



Fonte: autoria própria

Figura 37: Leveduras após período de incubação em meio indutor de hifas.



Fonte: autoria própria



#### 4.5. AVALIAÇÃO DA IDADE, GRAU DE ERP, CARGA VIRAL E CONTAGEM DE LINFÓCITOS TCD4+

Os dados obtidos de ambos os grupos (GI e GII) estão apresentados na tabela 3. Avaliando o grau de ERP, os pacientes foram distribuídos em 33 com tipo IA, 14 com tipo IB, 4 com tipo II e 4 com tipo III (Figura 38).

A carga viral foi classificada como indetectável em 13 pacientes (59% dos pacientes do grupo experimental), evidenciando a eficácia e correta aderência ao TARV, impedindo a transmissão do vírus e desenvolvimento da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). Diretamente influenciado pela baixa contagem de carga viral do vírus HIV, a contagem de células T-CD4+ foi em média de 565 células por  $\text{mm}^3$ , considerada normal em pacientes adultos.

Quanto aos testes de correlação para o grupo experimental, foi encontrada correlação negativa moderada entre a contagem inicial do biofilme de não-albicans e grau de ERP em que, quanto menor a contagem de UFC, maior o grau de ERP ( $\rho = -0,592$ ,  $p = 0,020$ ). Não foi encontrada correlação entre ERP e carga viral ( $p = 0,1772$ ), bem como entre ERP e T-CD4+ ( $p = 0,3624$ ).

Figura 38: Distribuição da frequência das manifestações de ERP segundo a escala de Newton modificada entre os grupos controle e experimental

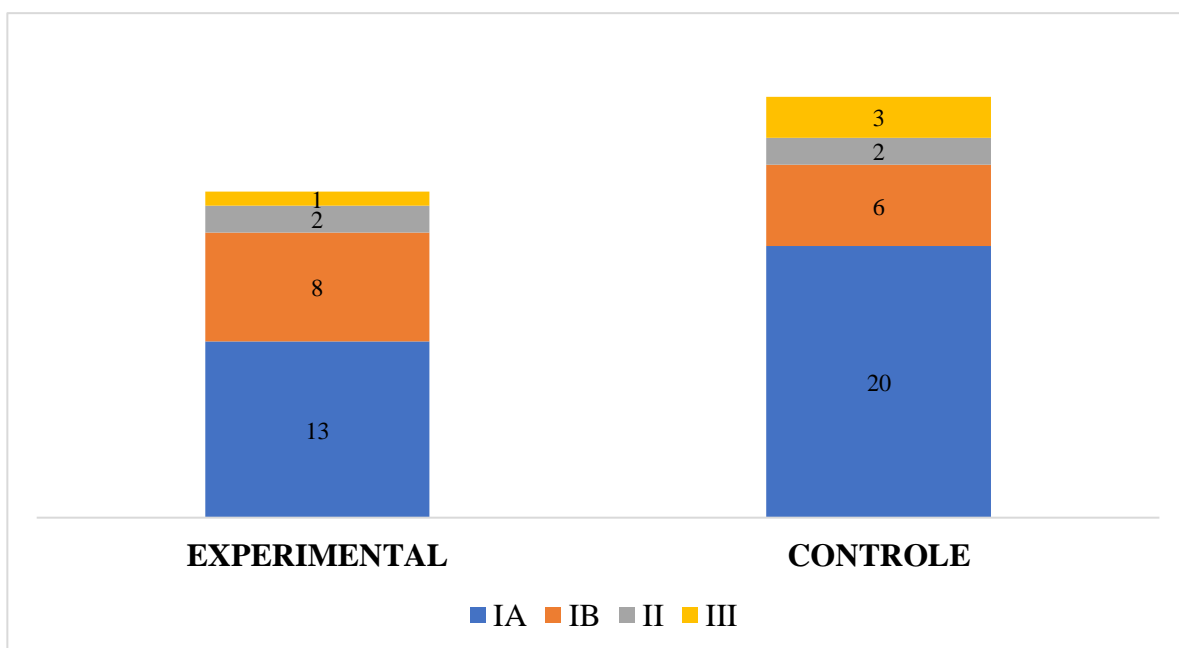


Tabela 3: Grau de ERP, carga viral e contagem de linfócitos T-CD4+ de usuários de próteses com ERP – Grupos experimental e controle.

Amostra	Grupo	Grau ERP*	Carga Viral**	Contagem T-CD4+***
1	+	IA	<200	657
2	+	IA	<200	800
3	+	II	<200	200
4	+	II	4568	223
5	+	III	542	622
6	+	IA	Indetectável	712
7	+	IA	Indetectável	512
8	-	IB	-	-
9	+	IB	485	589
10	+	IA	526	558
11	+	IA	Indetectável	480
12	-	IA	-	-
13	-	IA	-	-
14	-	III	-	-
15	-	IB	-	-
16	-	IA	-	-
17	-	IB	-	-
18	-	II	-	-
19	-	IB	-	-
20	-	IA	-	-
21	+	IB	Indetectável	697
22	+	IA	Indetectável	254
23	-	IA	-	-
24	-	IA	-	-
25	+	IB	Indetectável	480
26	-	IA	-	-
27	-	IA	-	-
28	+	IB	Indetectável	697
29	-	IA	-	-
30	-	III	-	-
31	-	IA	-	-

Tabela 3: Continuação

Amostra	Grupo	Grau ERP*	Carga Viral	Contagem T-CD4+
32	-	IA	-	-
33	-	IB	-	-
34	-	IA	-	-
35	+	IB	Indetectável	512
36	-	IA	-	-
37	+	IA	Indetectável	418
38	-	III	-	-
39	-	IB	-	-
40	-	IA	-	-
41	-	IA	-	-
42	-	IB	-	-
43	-	IA	-	-
44	-	II	-	-
45	-	IA	-	-
46	-	IB	-	-
47	-	IA	-	-
48	-	IA	-	-
49	+	71	IA	560
50	+	56	IA	Indetectável
51	+	65	IA	Indetectável
52	-	62	IA	-
53	+	67	IA	Indetectável
54	+	81	IB	520
55	+	69	IA	Indetectável

“-“ Dado não obtido no grupo 2 \*Escala de Newton modificada <sup>59</sup> \*\*Cópias/mm<sup>3</sup> \*\*\*Células/mm<sup>3</sup>

---

# 5. DISCUSSÃO

---



A ocorrência de doenças oportunistas continua sendo um dos maiores desafios na manutenção da saúde de pacientes portadores do vírus HIV. Com o passar dos anos, a adoção e aperfeiçoamento do tratamento antirretroviral tem melhorado a expectativa e qualidade de vida dos pacientes com essa condição. Sabe-se, porém, que outras infecções são frequentemente diagnosticadas nestes pacientes, como as fúngicas, especialmente por espécies de *Candida* (37–39). Partindo deste pressuposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a prevalência, virulência e morfologia de cepas de *Candida* spp. isoladas de biofilmes de pacientes usuários de próteses totais removíveis com estomatite relacionado a prótese (ERP), com e sem o diagnóstico de HIV.

A avaliação da colonização de pacientes por essas cepas depende da correta coleta e identificação desses microrganismos, sendo o ágar cromogênico, como o CHROMagar *Candida*, um dos meios mais utilizados para identificação primária dessas cepas (56,58). Já com a finalidade de confirmação desta identificação, o teste de Reação em Cadeia da Polimerase vem se concretizando como metodologia molecular mais apurada na titulação de diversos microrganismos (61–64). Sendo assim, o presente estudo realizou o isolamento das cepas e confirmação da identificação por meio de ambos os testes. Foram realizadas 55 coletas em pacientes com estomatite protética (33 controle/ 22 experimental), com 63 cepas de *Candida* spp isoladas (31 controle/32 experimental). O perfil de colonização foi caracterizado por um total de 28 *C. albicans* (44,4%), 18 *C. tropicalis* (28,5%), 10 *C. glabrata* (15,8%), 6 *C. dubliniensis* (9,5%) e 1 outra espécie de *Candida* (1,5%). Outros estudos já analisaram este tipo de colonização em pacientes que vivem com o HIV, concordando com os resultados apontados por este estudo. A espécie *C. albicans* é a espécie mais comumente isolada em diversos estudos, com índice de 66,7% em Sanchez-Vargas *et al.*(65), 50% em Costa *et al.*(64), 71,8% em Clark-Ordonez *et al.* (38), 32,52% em Ribeiro *et al.* (39) e variação de 37,2 a 95,2% em revisão de literatura conduzida por Patil *et al.* (40).

Em relação à outras espécies de *Candida*, os estudos mostram grande variação dos resultados. Erkoese *et al.*(66) isolaram cepas de *C. glabrata* (22,6%) e *C. dubliniensis* (11,3%), Sanchez-Vargas *et al.*(65) não isolaram nenhuma cepa de *C. dubliniensis*. Tais dados diferem da presente análise, onde cepas de *C. dubliniensis* compôs 9,5% das cepas isoladas. Sendo assim, podemos considerar que a análise de isolamento na maioria dos estudos traz a maioria das cepas isoladas de *C. albicans* seguida de outras espécies (38,48,58,61,67–71). Porém, deve-se considerar que esses estudos não compararam a colonização entre pacientes que vivem com HIV e um grupo controle, ou uso de próteses.

Nossos resultados mostraram maior colonização no grupo experimental (HIV+) com médias de 1,45 cepas por paciente e 0,93 cepas por paciente no grupo controle (HIV-); porém, sem diferenças estatísticas entre os grupos. Back-Brito *et al.*(48) encontraram relação entre a sorologia do paciente e sua colonização por *Candida* spp., com uma maior frequência no grupo de pessoas que viviam com HIV. A análise deste estudo permite inferir a ocorrência de uma maior frequência de colonização pelo fungo em pacientes que vivem com o HIV, mesmo com o sucesso da implantação do TARV. Não há muitos estudos disponíveis comparando a colonização de *Candida* spp. em pessoas com e sem infecção pelo vírus HIV, porém verifica-se uma tendência de maiores números de cepas nos estudos que avaliaram o grupo com a infecção. Ressalta-se que a ocorrência desse maior número de cepas deve ser analisada considerando o caráter multifatorial de uma infecção. Como um desses fatores, temos a vulnerabilidade dessas pessoas, visto que, frequentemente, enfrentam condições mais restritas de acesso a higiene correta, autocuidado e acompanhamento odontológico e médico.

Os fatores de virulência de um microrganismo facilitam o desenvolvimento da infecção por meio de diversos mecanismos. A capacidade de produção de biofilme pode ser considerada um dos fatores mais importantes de proteção e proliferação de cepas (42,45). Essa produção colabora também com a resistência a medicamentos antifúngicos e dificulta a remoção mecânica do fungo, colaborando concomitantemente com outros fatores de virulência, com a progressão da infecção, incluindo possíveis casos fatais (45). Considerando essa produção, um estudo prévio não encontrou diferenças significativas entre espécies não albicans com *C. albicans* (72), o que corrobora com os dados obtidos na presente análise, onde não houve diferença entre os grupos de pacientes (experimental e controle), e de cepas (*C. albicans* quanto não-albicans) tanto em baseline quando no teste de capacidade de produção.

Apesar disso, estudo anterior comparando o crescimento do biofilme de *C. albicans* em pacientes com e sem infecção pelo vírus HIV concluiu que o biofilme de pacientes portadores do vírus apresentou uma maior velocidade de crescimento ( $p < 0,001$ ), além de um maior número de colônias formadas em 48 horas ( $8,6 \times 10^6$  cel/ml no grupo HIV e  $7,8 \times 10^6$  cel/ml no grupo controle)(73). Considerando estes resultados conflitantes, não foi possível confirmar a hipótese de maior crescimento de biofilme em pacientes portadores do vírus HIV. Apesar do resultado estatístico sem diferenças obtidos pelo estudo, deve-se avaliar a diferença logarítmica e numérica relacionada, sendo em diversos casos a diferença de 1 log notada entre as amostras. Salienta-se que a diferença de 1 log entre amostras representa uma diferença de 90% na entre estas. Deve-se considerar também que o uso do TARV pode desempenhar um papel importante

neste controle de crescimento, tanto no tocante à melhora da resposta imune do paciente, quando na diminuição de outros fatores de virulência da cepa.

Mesmo que em diferentes quantidades, os resultados do presente estudo demonstraram que todas as cepas foram capazes de produzir biofilme. Já em estudo realizado no Nepal em 2020 com 174 pacientes portadores do vírus HIV, em esfregaços na região da orofaringe, foram isoladas um total de 41 cepas de *Candida* spp., onde 61% das espécies eram produtoras de biofilme, e 10% de *C. albicans* e não albicans tiveram um alto índice de produção (74). É importante discutir que essa variação na produção de biofilme ocorre de forma atenuada entre diferentes espécies de *Candida*. A análise da produção do biofilme entre as diferentes espécies não foi possível, já que o presente estudo considerou apenas dois grupos, somando todas as espécies não-albicans como apenas um índice, impossibilitando a visualização desta variação. Deve-se considerar também que o estudo realizado no Nepal não considerou pacientes que faziam uso de aparelhos protéticos, não havendo estudos disponíveis que façam a comparação da associação HIV e próteses quanto a produção de biofilme.

Além da produção, o metabolismo celular do biofilme é uma importante característica que define sua viabilidade (57). Para essa avaliação, o teste de metabolização do sal de tetrazólio foi utilizado, e não foram encontradas diferenças na metabolização tanto entre os grupos amostrais quanto entre os grupos de espécies. Na tentativa de comparar esses dados com estudos prévios, concluímos que análises sobre o metabolismo deste biofilme não têm sido amplamente relatadas. Apenas um estudo avaliou o metabolismo do biofilme de *Candida* spp. em pacientes portadores do vírus HIV, neste, Portela *et al.*(42) encontraram maiores valores na metabolização entre amostras de *C. albicans* em comparação com não-albicans ( $p < 0,05$ ). Essa escassez de estudos dificulta a análise desta característica, já que a capacidade de produção de biofilme nem sempre indica um maior metabolismo das cepas que os compõem. Além da produção e metabolismo do biofilme, entender outros fatores de virulência dessas espécies é essencial para a análise da patogenicidade dessas cepas.

Outro fator analisado, que também interfere diretamente na patogenia das cepas, refere-se à produção de exoenzimas como mecanismo de defesa e invasão. Entre as exoenzimas mais amplamente discutidas, podem ser elencadas a proteinase e fosfolipase (41–48,61,68–70). No presente estudo não foi encontrado diferença na produção de fosfolipase entre os grupos experimental e controle tanto para *C. albicans* ( $p=0,786$ ) quanto para outras espécies de *Candida* ( $p=0,588$ ). Na literatura, os estudos divergem quanto a diferença na capacidade de produção de fosfolipase entre um grupo controle e outro portador do vírus HIV. Em Aleva *et*



al.(68) foram comparados dois grupos de pacientes, um com próteses totais sem diagnóstico do vírus HIV e outro sem próteses com o diagnóstico pelo vírus, encontrando um maior número de cepas produtoras de fosfolipase em pessoas que vivem com HIV (96%) em comparação ao grupo sem infecção pelo vírus (76%).

Nos resultados da produção de proteinase do presente estudo foi encontrada diferença significativa entre o grupo controle e experimental para *C. albicans* ( $p=0,031$ ), com maiores valores para pacientes controle. Foram encontradas diferenças também entre não-albicans, com maiores valores no grupo experimental ( $p=0,016$ ). Esta menor produção de proteinase por *C. albicans* em pacientes portadores do vírus HIV pode ser explicada pelo uso de inibidores de proteinase (como parte da terapia antirretroviral). Segundo Aleva *et al.*(68), medicamentos pertencentes ao tratamento de infecção pelo HIV atuam na diminuição da produção da enzima por *Candida* spp., dificultando a infecção pelo fungo. Em estudo de Back-Brito *et al.* (69), cepas isoladas do grupo de pacientes HIV apresentaram alta atividade enzimática, onde 82% dos pacientes apresentaram alta produção de proteinase e 18% sem produção. No grupo controle este número foi de 48% para alta produção e 52% sem produção. Segundo Junqueira *et al.*(70), a produção enzimática foi verificada em todas as espécies analisadas, exceto para *C. glabrata*, *C. lusitaniae* e *C. guilliermondii*. De Paula *et al.*(61), em seu estudo, demonstraram que todas as cepas de *Candida* spp. apresentaram produção de fosfolipase e 36,8% produção de proteinase.

Outras condições sistêmicas foram consideradas em estudo anterior, onde a atividade proteolítica foi identificada em 46% das cepas isoladas de pacientes oncológicos, 54% em pacientes HIV+, 60% em pacientes diabéticos, 70% em pacientes com sinais de candidíase oral e 42% em indivíduos saudáveis (47). A análise da produção das exoenzimas que auxiliam na invasão tecidual do hospedeiro tem se mostrado especialmente importante quando se considera pacientes portadores do vírus HIV. O TARV vem se consolidando como um possível auxiliar no controle de produção de proteinase, mas quando consideramos a excreção de fosfolipase os estudos são controversos. Há ainda que se considerar que parte da população portadora do vírus não tem acesso ao medicamento comumente empregado no controle da infecção, ficando estes vulneráveis aos desdobramentos causados pela síndrome induzida pelo vírus (SIDA). Indivíduos não tratados, em linhas gerais, apresentam piores índices de saúde como maior carga viral e, conseqüentemente, menor contagens de célula T-CD4+, tendo assim seu sistema imune prejudicado (45).

A variação na morfologia de *Candida*, ou plasticidade morfológica, é caracterizada pela produção de hifas e acontece em diferentes espécies de *Candida*, exceto em cepas de *C. glabrata*.

As hifas são caracterizadas por prolongamentos citoplasmáticos na estrutura da cepa, facilitando sua mobilidade, absorção de nutrientes, aderência ao epitélio e reprodução(75). Essas hifas têm sido encontradas, com maior frequência, em tecidos que apresentam sinais de infecção pelo fungo, sendo então um possível marcador da evolução da infecção(76). Na presente avaliação de produção de Hifas, foi possível verificar uma maior produção de hifas em espécies não-albicans em ambos os grupos (experimental e controle). Não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos, tanto para *C. albicans*, como para não-albicans. Há falta de estudos que levam em conta a comparação da produção de hifas em pacientes portadores do vírus HIV e saudáveis, no único estudo encontrado o número de hifas foi maior para *C. albicans*, em pacientes HIV, porém sem diferenças estatísticas (73). Esta informação discorda do presente estudo, porém um número maior de amostras deve ser analisado, já que o estudo em questão avaliou apenas vinte pacientes portadores do HIV.

Uma das melhores formas de entender a patogenia de uma infecção é compreender a forma que esta evolui em pacientes com diferentes condições sistêmicas. Apesar da presumível correlação entre índices de saúde, parte dos estudos anteriores não encontraram relação entre a contagem de células T-CD4+, carga viral, idade, gênero e tabagismo (51,70). Portela *et al.*(42) concluíram que fatores de virulência não foram potencializados, e, em alguns casos, reduzidos em pacientes com diversas condições sistêmicas. No presente estudo foi verificado baixa correlação entre a contagem de células T-CD4+, carga viral e a colonização por espécies de *Candida*. Na análise, porém, devemos considerar a natureza dos grupos que participaram do estudo, sendo em sua maioria pacientes saudáveis ou com infecção pelo HIV controladas pelo uso do TARV (carga viral baixa ou indetectável e T-CD4+). Por outro lado, Back-Brito *et al.*(69) evidenciaram relação entre a carga viral e a colonização fúngica entre os pacientes com HIV, onde aqueles que apresentavam baixa contagem do vírus (<400 cópias/mm<sup>3</sup>) eram menos colonizados por *Candida* spp. (p= 0.0230). Patil *et al.*(40), Aboualigalehdari *et al.*(50), Ambe *et al.*(77) e Du *et al.*(49) também encontraram relação entre a contagem de T-CD4+ e a infecção fúngica, especialmente em contagens de T-CD4+ menores de 200 células/mm<sup>3</sup>. Estes autores também concluíram que o inibidor de proteinase, um dos componentes terapêuticos principais no TARV, diminui essa enzima produzida pelo vírus HIV, e que estas apresentam estrutura

semelhante as produzidas por cepas de *Candida* spp; esta afirmação foi apoiada por Menezes *et al*(43).

Considerando os resultados obtidos e a literatura revisada é possível entender que há evidências da correlação entre contagem de células T-CD4+ e a colonização por *Candida* spp.; esta evidência deve ser confirmada em análises futuras comparando um maior número de cepas em grupos diferentes de pacientes. A carga viral para HIV também parece como um índice correlacionado à colonização por *Candida* spp. Esta correlação pode se basear no mecanismo de replicação do vírus HIV que faz uso de células do sistema imune (especialmente T CD4+ e T CD8+), destruindo-as, tendo como consequência um rebaixamento do sistema imune causando uma maior susceptibilidade do hospedeiro a infecções.

Ao analisar a colonização por *Candida* spp. em qualquer grupo de pacientes, deve-se também considerar seu caráter comensal na maioria dos casos. Várias espécies de *Candida* são reconhecidamente parte da microbiota oral de pacientes saudáveis, especialmente *C. albicans* (78). A evolução dessa colonização para um quadro de infecção depende de fatores muitas vezes inerentes ao hospedeiro, como alteração na resposta imunológica, frequente não somente em pacientes portadores do vírus HIV, mas como também em diabéticos, hipertensos e usuários de imunossupressores (pacientes com transtornos imunológicos, transplantados, oncológicos, entre outros).

O grau de ERP encontrado quando analisado a mostra foi de 33 com tipo IA, 14 com tipo IB, 4 com tipo II e 4 com tipo III. A maioria dos pacientes foi diagnosticado com a forma mais branda de estomatite, caracterizada por petéquias no palato, podendo sugerir uma melhor condição sistêmica do paciente ou da condição do aparelho protético. Neste estudo a carga viral do grupo experimental foi classificada como indetectável em 13 pacientes (59% dos pacientes do grupo experimental), evidenciando a eficácia e correta aderência ao TARV. Devemos considerar que os pacientes que foram incluídos nos grupos amostrais são constantemente acompanhados pela equipe médica e odontológica nas unidades que foram realizadas tal coleta. Considerando tal condição, estes apresentam condições mais favoráveis para a mitigação dessas lesões, evitando a evolução do quadro. Tal cuidado possibilita um melhor controle das condições de saúde dos pacientes que compuseram o grupo amostral, tanto sistêmico quanto oral.

Ainda sobre ERP, no grupo experimental, foi encontrada correlação negativa moderada com contagem do biofilme em *baseline* de não-albicans em que, quanto menor a contagem de

UFC, maior o grau de ERP. Esse dado pode ser explicado pelo caráter multifatorial da ERP, onde não somente a presença do biofilme é causadora da inflamação da mucosa de suporte da prótese. Próteses mal adaptadas, ou confeccionadas incorretamente podem funcionar como fator irritante, induzindo a inflamação da área. Próteses desadaptadas ou fraturadas foram excluídas do estudo, porém uma análise mais detalhada no aparelho desses pacientes, assim como de sua cavidade de oral, deve ser performada para a exclusão da possibilidade de existência de áreas possivelmente traumatizantes. Em estudo de Andrucio *et al* (79), utilizando um produto para higienização de próteses, não foi diagnosticada melhora em lesões de ERP mesmo após a diminuição do biofilme, demonstrando novamente que a quantidade de biofilme pode não ser um fator determinante do grau de ERP.

Ainda quando consideramos pacientes portadores do vírus HIV, a interação entre fatores de virulência e condição sistêmica se torna ainda mais complexa. Diversas correlações podem ser levantadas, como a possibilidade de o aparelho protético agir como facilitador de acúmulo de biofilme, do TARV interferir na produção de exoenzimas importantes no desenvolvimento de uma infecção, o aumento das células de defesa em pacientes com tratamento correto, além do baixo padrão de higienização destes pacientes que os levaram ao edentulismo. Quanto às próteses sabemos que quando não corretamente higienizadas, estas podem desempenhar o papel de reservatório para a proliferação de microrganismos oportunistas (80), e que o TARV desempenha um importante papel no controle da carga viral e, conseqüentemente, da resposta imunológica nestes hospedeiros (49). Além disso, fatores que podem influenciar a colonização oral por *Candida* spp. já explorados são a baixa contagem de células T-CD4+ e comportamentos de risco como histórico de compartilhamento de seringas e relação sexual desprotegida(50). Considerando os poucos estudos envolvendo pacientes portadores do vírus HIV e uso de próteses, a correta associação entre o aparelho protético e a alteração da virulência dos microrganismos nestes pacientes ainda é inconclusiva.

Como citado anteriormente, há resultados precedentes que indicam a modificação de produção de proteinases em cepas de hospedeiros que fazem o uso de medicamentos pertencentes ao TARV, o que poderia levar a uma proteção tecidual nestes pacientes, diminuindo os casos e gravidade de infecções. Porém, assim como observado neste e em outros estudos (37–39,81), o grande número de cepas isoladas e casos de lesões relacionadas a *Candida* spp. nestes pacientes despertam preocupação, considerando a potencial fragilidade deste grupo a infecções.

Considerando as várias análises realizadas no presente estudo, podemos sugerir um alto índice de isolamento de *Candida* spp. em pacientes que vivem com HIV, além de também considerável colonização em pacientes saudáveis. O uso de próteses dentais, quando comparado a estudos com grupos sem o aparelho, parece não desempenhar grande influência tanto no crescimento e metabolismo do biofilme e produção das exoenzimas analisadas, uma vez que, independentemente da presença da prótese os resultados foram equivalentes ao encontrado na literatura disponível. Deve-se lembrar os vários aspectos já citados que influenciam de forma mais direta o crescimento da espécie na cavidade oral, como a falta de higienização ou manutenção dos aparelhos.

Devemos considerar como limitação desse estudo, o número reduzido de cepas obtidas para a comparação dos dados de colonização, fatores de virulência e morfologia de *Candida* spp. Sendo assim, torna-se importante a realização de estudos futuros com maior número amostral, possibilitando uma análise mais aprofundada destes importantes fatores. Outro ponto a ser considerado foi a realização de uma única coleta, sendo também importante a condução de estudos com períodos experimentais mais longos, possibilitando o acompanhamento dos pacientes. Neste contexto, deve ser considerado o acompanhamento constante da patogenicidade de cepas de *Candida* spp. além da manutenção das próteses dentais e métodos adequados de higiene, em pacientes com ou sem HIV.

---

# *CONCLUSÕES*

---

## CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos e dentro das limitações deste estudo, comparando espécies de *Candida* spp. em pacientes com e sem o diagnóstico de HIV, foi possível concluir que.:

- Quanto à prevalência, a *C. albicans* foi a espécie mais isolada em ambos os grupos.
- Quanto aos fatores de virulência:
  - Não houve diferença significativa entre os grupos quanto à capacidade de formação de biofilme, metabolismo celular e produção de fosfolipase (espécies *C. albicans* e não-*albicans*).
  - Houve diferença significativa entre os grupos quanto à produção de proteinase, com maiores valores para as espécies *C. albicans* em pacientes sem o diagnóstico de HIV e para espécies não-*albicans* em pacientes com o diagnóstico de HIV.
- Quanto à morfologia, não houve diferença significativa entre os grupos (espécies *C. albicans* e não-*albicans*).
- Quanto à correlação das análises microbiológicas com o grau de ERP, carga viral e contagem de linfócitos T-CD4+:
  - Foi encontrada correlação negativa moderada entre a contagem inicial do biofilme e grau de ERP para espécies não-*albicans* no grupo experimental.
  - Não foi encontrada correlação do teste de formação do biofilme com os dados de ERP, de carga viral e de contagem de linfócitos T-CD4+; bem como da ERP com carga viral e contagem de linfócitos T-CD4+ no grupo experimental.





---

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---



1. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). Progress towards the 90-90-90 targets Ending AIDS. Global AIDS update 2017. 2017. Disponível em: [https://www.unaids.org/en/resources/documents/2017/20170720\\_Global\\_AIDS\\_update\\_2017](https://www.unaids.org/en/resources/documents/2017/20170720_Global_AIDS_update_2017). (Citado em mar 2020)
2. CNF A, MM S, MM B, V de CO, AP M, CH S-L, et al. Effect of sodium hypochlorite and *Ricinus communis* solutions on control of denture biofilm: A randomized crossover clinical trial. *The Journal of prosthetic dentistry*, 117(6):729–34, 2017.
3. World Health Organization (WHO). Global HIV, Hepatitis and STIs Programme [Internet]. HIV Update. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/teams/global-hiv-hepatitis-and-stis-programmes/data-use/hiv-data-and-statistics>. [Citado em Jan 2021]
4. Brazil. Casos e mortes causados pela Aids no país — Português (Brasil) [Internet]. Saúde e Vigilância Sanitária, 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/pt-br/noticias/saude-e-vigilancia-sanitaria/2020/12/cai-o-numero-de-casos-e-mortes-causados-pela-aids-no-pais>. [citado em 2021 Jan]
5. Scully C, El-Kabir M, Samaranayake LP. *Candida* and oral candidosis: a review. *Critical reviews in oral biology and medicine*, 5(2):125–57, 1994.
6. De Almeida VL, Lima IFP, Ziegelmann PK, Paranhos LR, De Matos FR. Systematic Review Oral Medicine Impact of highly active antiretroviral therapy on the prevalence of oral lesions in HIV-positive patients: a systematic review and meta-analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 46:1497–504, 2017.
7. Barros LM, Boriollo MFG, Alves ACBA, Klein MI, Gonçalves RB, Höfling JF. Genetic diversity and exoenzyme activities of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* isolated from the oral cavity of Brazilian periodontal patients. *Archives of Oral Biology*, 53(12):1172–8, 2008.
8. Ganguly S, Mitchell AP. Mucosal biofilms of *Candida albicans*. *Current Opinion in Microbiology*, 14(4):380–5, 2011.
9. Kato IT, Prates RA, Sabino CP, Fuchs BB, Tegos GP, Mylonakis E, et al. Antimicrobial photodynamic inactivation inhibits *Candida albicans* virulence factors and reduces in vivo pathogenicity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(1):445–51, 2013.
10. Patil S, Rao RS, Majumdar B, Anil S. Clinical appearance of oral *Candida* infection and therapeutic strategies. *Frontiers in Microbiology*, 17;6:1391, 2015.
11. Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, Powderly W, et al. A Prospective Observational Study of Candidemia: Epidemiology, Therapy, and Influences on Mortality in Hospitalized Adult and Pediatric Patients. *Clinical Infectious Diseases*, 37(5):634–43, 2003.
12. Turner MD, Ship JA. Dry mouth and its effects on the oral health of elderly people. *Journal of the American Dental Association*, 138 Suppl:15S-20S, 2007.
13. Martori E, Ayuso-Montero R, Martinez-Gomis J, Viñas M, Peraire M. Risk factors for denture-related oral mucosal lesions in a geriatric population. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 111(4):273–9, 2014.
14. Badaró MM, Bueno FL, Arnez RM, Oliveira V de C, Macedo AP, de Souza RF, et al. The effects of three disinfection protocols on *Candida* spp., denture stomatitis, and biofilm: A parallel group randomized controlled trial. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 124(6):690–8, 2020.

15. Lalla R V, Patton LL, Dongari-Bagtzoglou A. Oral candidiasis: pathogenesis, clinical presentation, diagnosis and treatment strategies. *Journal of the California Dental Association*, 41(4):263–8, 2013.
16. dos Santos CM, Hilgert JB, Pereira Padilha DM, Hugo FN, Padilha DMP, Hugo FN. Denture stomatitis and its risk indicators in south Brazilian older adults. *Gerodontology*, 22;27(2):134–40, 2010.
17. Emami E, Kabawat M, Rompre PH, Feine JS. Linking evidence to treatment for denture stomatitis: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Dentistry*, 42(2):99–106, 2014.
18. Van De Veerdonk FL, Kullberg BJ, Netea MG. Pathogenesis of invasive candidiasis. *Current Opinion in Critical Care*, 16(5):453–9, 2010.
19. Li L, Dongari-Bagtzoglou A. Epithelial GM-CSF induction by *Candida glabrata*. *Journal of dental research*, 88(8):746–51, 2009.
20. Nawrot U, Skąła J, Włodarczyk K, Fonteyne PA, Nolard N, Nowicka J. Proteolytic activity of clinical *Candida albicans* isolates in relation to genotype and strain source. *Polish Journal of Microbiology*, 57(1):27–33, 2008.
21. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*, 1;9(7):327–35, 2001.
22. Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M, Kozik A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta biochimica Polonica*, 56(2):211–24, 2009.
23. De Aguiar MMGB, De Albuquerque RP, Marinho DS, Braga BRS, Dornelas CB, Oliveira A, et al. Oral sustained release nystatin tablets for the treatment of oral candidiasis: Formulation development and validation of UV spectrophotometric analytical methodology for content determination. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 36(5):594–600, 2010.
24. de Souza RF, Khiyani MF, Chaves CALL, Feine J, Barbeau J, Fuentes RR, et al. Improving practice guidelines for the treatment of denture-related erythematous stomatitis: A study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*, 18(1):211, 2017.
25. Haynes K, Barros LM, Boriollo MFG, Alves ACBA, Klein MI, Gonçalves RB, et al. REVIEW ARTICLE *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Archives of Oral Biology*, 57(1):193–8, 2010.
26. Polzer I, Schimmel M, Müller F, Biffar R. Edentulism as part of the general health problems of elderly adults. *International dental journal*, 60(3):143–55, 2010.
27. Bernabe E, Marcenes W, Hernandez CR, Bailey J, Abreu LG, Alipour V, et al. Global, Regional, and National Levels and Trends in Burden of Oral Conditions from 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease 2017 Study. *Journal of Dental Research*, 2;99(4):362–73, 2020.
28. Colussi CF, Patel FS. Uso e Necessidade de Prótese Dentária no Brasil: avanços, perspectivas e desafios. *Saude & Transformação Social*, 7(1):41–8, 2010.
29. Brito D, Fernández J, Castillo MA, Azuero S, Hernández-Valles R, Saúl-García Y, et al. Fluconazole and voriconazole susceptibility in oral colonization isolates of *Candida* spp. In HIV patients. *Investigacion Clinica (Venezuela)*, 60(4):275–82, 2019.

30. Ngouana TK, Toghueo RMK, Kenfack IF, Lachaud L, Nana AK, Tadjou L, et al. Epidemiology and antifungal susceptibility testing of non-albicans *Candida* species colonizing mucosae of HIV-infected patients in Yaoundé (Cameroon). *Journal de Mycologie Medicale*, 1;29(3):233–8, 2019.
31. Friedman DZP, Schwartz IS. Emerging fungal infections: New patients, new patterns, and new pathogens. *Journal of Fungi*, 20;5(3):67, 2019.
32. Murtiastutik D, Maharani CS, Rahmadewi, Listiawan MY. Nystatin profile on *Candida* species in HIV/AIDS patients with oral candidiasis: A phenomenology study. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 13(4):2013–9, 2019.
33. Murtiastutik D, Prakoeswa CRS, Tantular IS. Fluconazole resistant oral candidiasis on HIV patient - What other drug can we choose? A case report. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 1;14(1):31–6, 2020.
34. Ma J, Shi H, Sun H, Li J, Bai Y. Antifungal effect of photodynamic therapy mediated by curcumin on *Candida albicans* biofilms in vitro. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1;27:280–7, 2019.
35. de Almeida-Apolonio AA, Cupozak-Pinheiro WJ, da Silva Dantas FG, Mattos K, Cardoso CAL, Negri M, et al. Myracrodruon urundeuva All. aqueous extract: A promising mouthwash for the prevention of oral candidiasis in HIV/AIDS patients. *Industrial Crops and Products*, 1;145(June 2019):111950, 2020.
36. Ribeiro FC, Rossoni RD, de Barros PP, Santos JD, Fugisaki LRO, Leão MPV, et al. Action mechanisms of probiotics on *Candida* spp. and candidiasis prevention: an update. *Journal of Applied Microbiology*, 129(2):175-185, 2020.
37. Lam-Ubol A, Rungsiyanont S, Vacharotayangul P, Sappayatosok K, Chankanka O. Oral manifestations, salivary flow rates and *Candida* species in Thai HIV-infected patients. *J Clin Exp Dent.*, 11(2):138–83, 2019.
38. Clark-Ordóñez I, Callejas-Negrete OA, Aréchiga-Carvajal ET, Mouriño-Pérez RR. *Candida* species diversity and antifungal susceptibility patterns in oral samples of HIV/AIDS patients in Baja California, Mexico. *Medical mycology*, 55(3):285–94, 2017.
39. Ribeiro AL, de Alencar Menezes TO, Alves-Junior S de M, de Menezes SA, Marques-da-Silva SH, Rosario Vallinoto AC. Oral carriage of *Candida* species in HIV-infected patients during highly active antiretroviral therapy (HAART) in Belem, Brazil. *Oral surgery oral medicine oral pathology oral radiology*, 120(1):29–33, 2015.
40. Patil S, Majumdar B, Sarode SC, Sarode GS, Awan KH. Oropharyngeal Candidosis in HIV-Infected Patients—An Update. *Frontiers in Microbiology*, 15;9(MAY):980, 2018.
41. Orlandini RK, Bepu DAN, Saraiva M da CP, Bollela VR, Motta ACF, Lourenço AG. Are *Candida albicans* isolates from the oral cavity of HIV-infected patients more virulent than from non-HIV-infected patients? Systematic review and meta-analysis. *Microbial Pathogenesis*, 149(September), 2020.
42. Portela MB, de Amorim EL, Santos AM, da Rocha Curvelo JA, Martins K de O, Capille CL, et al. *Candida* species from oral cavity of HIV-infected children exhibit reduced virulence factors in the HAART era. *Microbial pathogenesis*, 102:74–81, 2017.

43. de Paula MENEZES R, Sebastião BORGES A, Borges de ARAUJO L, dos Santos PEDROSO R, Von Dolinger de Brito RÖDER D. Related factors for colonization by *Candida* species in the oral cavity of hiv-infected individuals. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 57(5):413–9, 2015.
44. Lahkar V, Saikia L, Patgiri SJ, Nath R, Das PP. Estimation of biofilm, proteinase & phospholipase production of the *Candida* species isolated from the oropharyngeal samples in HIV-infected patients. *Indian Journal of Medical Research*, 1;145(May):635–40, 2017.
45. de Paula SB, Morey AT, Santos JP, dos Santos PMCC, Gameiro DG, Kerbauy G, et al. Oral *Candida* colonization in HIV-infected patients in Londrina-PR, Brazil: Antifungal susceptibility and virulence factors. *Journal of Infection in Developing Countries*, 30;9(12):1350–9, 2015.
46. Hernandez-Solis SE, Rueda-Gordillo F, Rojas-Herrera RA. Actividad de la proteinasa en cepas de *Candida albicans* aisladas de la cavidad oral de pacientes inmunodeprimidos, con candidiasis oral y sujetos sanos. *Revista iberoamericana de micología*, 31(2):137–40, 2014.
47. Mane A, Pawale C, Gaikwad S, Bembalkar S, Risbud A. Adherence to buccal epithelial cells, enzymatic and hemolytic activities of *Candida* isolates from HIV-infected individuals. *Medical mycology*, 49(5):548–51, 2011.
48. Back-Brito GN, El Achkar VNR, Garbim AL, Romeiro R de L, 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. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 70(2):101–5, 2011.
49. Du X, Xiong H, Yang Y, Yan J, Zhu S, Chen F. Dynamic study of oral *Candida* infection and immune status in HIV infected patients during HAART. *Archives of Oral Biology*, 115(April):104741, 2020.
50. Aboualigalehdari E, Birgani MT, Fatahinia M, Hosseinzadeh M. Oral colonization by *Candida* species and associated factors in HIV-infected patients in Ahvaz, southwest Iran. *Epidemiology and Health*, 42:1–7, 2020.
51. Sah P, Patel P, Chandrashekar C, Martena S, Ballal M, Hegde M, et al. Oral candidal carriage correlates with CD4+ cell count but not with HIV and highly active antiretroviral therapy status. *Journal of investigative and clinical dentistry*, 10(4):12438, 2019.
52. Mostefaoui Y, Bart C, Frenette M, Rouabhia M. *Candida albicans* and *Streptococcus salivarius* modulate IL-6, IL-8, and TNF- $\alpha$  expression and secretion by engineered human oral mucosa cells. *Cellular Microbiology*, 6(11):1085–96, 2004.
53. Newton AV. Denture Sore Mouth: a possible etiology. *British Dental Journal*, 357–60, 1962.
54. Emami E, Séguin J, Rompré PH, de Koninck L, de Grandmont P, Barbeau J. The relationship of myceliated colonies of *Candida albicans* with denture stomatitis: an in vivo/in vitro study. *The International journal of prosthodontics*, 20(5):514–20, 2007.
55. Douglas CW, Lamb DJ. Denture sonication as a means of assessing denture-associated candidosis. *Gerodontics*, 4(6):289–92, 1988.
56. Pfaller MA, Houston A, Coffmann S. Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(1), 1996.
57. Pannanusorn S, Fernandez V, Römling U. Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of *Candida* species causing bloodstream infection. *Mycoses*, 56(3):264–72, 2013.

58. Mousavi SAA, Salari S, Rezaie S, Nejad NS, Hadizadeh S, Kamyabi H, et al. Identification of Candida Species Isolated From Oral Colonization in Iranian HIV-Positive Patients, by PCR-RFLP Method. *Jundishapur journal of microbiology*, 5(1):336–40, 2012.
59. Cornet M, Sendid B, Fradin C, Gaillardin C, Poulain D, Nguyen HV. Molecular identification of closely related Candida species using two ribosomal intergenic spacer fingerprinting methods. *Journal of Molecular Diagnostics*, 13(1):12–22, 2011.
60. Gulati M, Ennis CL, Rodriguez DL, Nobile CJ. Visualization of Biofilm Formation in Candida albicans Using an Automated Microfluidic Device. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* [Internet]. 130:56743, 2017. Available from: <https://www.jove.com/v/56743/visualization-biofilm-formation-candida-albicans-using-an-automated>
61. De Paula Menezes R, De Melo Riceto ÉB, Borges AS, De Brito Röder DVD, Dos Santos Pedroso R. Evaluation of virulence factors of Candida albicans isolated from HIV-positive individuals using HAART. *Archives of Oral Biology*, 66:61–5, 2016.
62. da Graça GC, Volpini AC, Romero GAS, Neto MP de O, Hueb M, Porrozzi R, et al. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(5):664–74, 2012.
63. Mahnss B, Stehr F, Schafer W, Neuber K. Comparison of standard phenotypic assays with a PCR method to discriminate Candida albicans and C. dubliniensis. *Mycoses*, 1;48(1):55–61, 2005.
64. Costa CR, Cohen AJ, Fernandes OFL, Miranda KC, Passos XS, Souza LKH, et al. Asymptomatic oral carriage of Candida species in HIV-infected patients in the highly active antiretroviral therapy era. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 48(5):257–61, 2006.
65. Sanchez-Vargas LO, Ortiz-Lopez NG, Villar M, Moragues MD, Aguirre JM, Cashat-Cruz M, et al. Oral Candida isolates colonizing or infecting human immunodeficiency virus-infected and healthy persons in Mexico. *Journal of clinical microbiology*, 43(8):4159–62, 2005.
66. Erkoese G, Erturan Z. Oral Candida colonization of human immunodeficiency virus infected subjects in Turkey and its relation with viral load and CD4(+) T-lymphocyte count. *Mycoses*, 50(6):485–90, 2007.
67. Satana D, Genc GE, Erturan Z. The antifungal susceptibilities of oral Candida spp. isolates from HIV-infected patients. *African journal of microbiology research*, 4(17):1831–5, 2010.
68. Aleva NA, Birman EG, Afonso W, Chavasco JK, Paula CR, Ribeiro A, et al. Erythematous candidosis in patients with complete dentures and HIV+/AIDS. *Mycoses*, 50(5):407–11, 2007.
69. Back-Brito GN, Mota AJ, Vasconcellos TC, Querido SMRR, Jorge AOCC, Reis ASMM, et al. Frequency of Candida spp. in the Oral Cavity of Brazilian HIV-Positive Patients and Correlation with CD4 Cell Counts and Viral Load. *Mycopathologia*, 167(2):81–7, 2009.
70. Junqueira JC, Fuchs BB, Muhammed M, Coleman JJ, Suleiman JMAH, Vilela SFG, et al. Oral Candida albicans isolates from HIV-positive individuals have similar in vitro biofilm-forming ability and pathogenicity as invasive Candida isolates. *BMC microbiology*, 4;11:247, 2011.
71. Merenstein D, Hu H, Wang C, Hamilton P, Blackmon M, Chen H, et al. Colonization by Candida Species of the Oral and Vaginal Mucosa in HIV-Infected and Noninfected Women. *Aids research and human retroviruses*, 29(1):30–4, 2013.
72. Ferreira A V., Prado CG, Carvalho RR, Dias KST, Dias ALT. Candida albicans and Non-C. albicans Candida Species: Comparison of Biofilm Production and Metabolic Activity in

- Biofilms, and Putative Virulence Properties of Isolates from Hospital Environments and Infections. *Mycopathologia*, 175(3–4):265–72, 2013.
73. Wibawa T, Praseno, Aman AT. Virulence of *Candida albicans* isolated from HIV infected and non infected individuals. *SpringerPlus*, 4(1):1–10, 2015.
  74. Adhikari KLN, Bastola A, Devkota L, Bhandari P, Dhungel B, Bipin Adhikari UTS, et al. Biofilm-producing candida species causing oropharyngeal candidiasis in hiv patients attending sukraraj tropical and infectious diseases hospital in kathmandu, nepal. *HIV/AIDS - Research and Palliative Care*, 12:211–20, 2020.
  75. Desai J V. *Candida albicans* hyphae: From growth initiation to invasion. *Journal of Fungi*, 4(1): 10, 2018.
  76. Moyes DL, Richardson JP, Naglik JR. *Candida albicans*-epithelial interactions and pathogenicity mechanisms: Scratching the surface. *Virulence*, 6(4):338–46, 2015.
  77. Ambe NF, Longdoh NA, Tebid P, Bobga TP, Nkfusai CN, Ngwa SB, et al. The prevalence, risk factors and antifungal sensitivity pattern of oral candidiasis in hiv/aids patients in Kumba District Hospital, South West Region, Cameroon. *Pan African Medical Journal*, 36:1–14, 2020.
  78. Soll DR. *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. *Acta Tropica*, 81(2):101–10, 2002.
  79. Andrucioi MCD, De Macedo LD, Panzeri H, Lara EHG, Paranhos HDFO. Comparison of two cleansing pastes for the removal of biofilm from dentures and palatal lesions in patients with atrophic chronic candidiasis. *Brazilian Dental Journal*, 15(3):220–4, 2004.
  80. Neppelenbroek KH. The importance of daily removal of the denture biofilm for oral and systemic diseases prevention. *Journal of Applied Oral Science*. 23:547–8, 2015.
  81. Lourenço AG, Ribeiro AERA, Nakao C, Motta ACF, Antonio LGL, Machado AA, et al. Oral *Candida* spp carriage and periodontal diseases in HIV-infected patients in Ribeirão Preto, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 59:1–7, 2017.





---

# APÊNDICES

---



## APÊNDICE A

Tabela A1 – Espécies de *Candida* isoladas dos pacientes do Grupos GI (+) e GII (-) identificadas por CHROMagar e confirmado por meio do teste de PCR.

<b>N</b>	<b>Grupo</b>	<b>Espécie</b>	<b>N</b>	<b>Grupo</b>	<b>Espécie</b>
<b>1</b>	+	<i>C. tropicalis</i>	<b>27</b>	-	<i>C. glabrata</i>
		<i>C. dubliniensis</i>	<b>28</b>	+	<i>C. tropicalis</i>
<b>2</b>	+	<i>C. tropicalis</i>	<b>29</b>	-	<i>C. tropicalis</i>
<b>3</b>	+	*			<i>C. dubliniensis</i>
<b>4</b>	+	<i>C. albicans</i>	<b>30</b>	-	<i>C. albicans</i>
<b>5</b>	+	<i>C. albicans</i>	<b>31</b>	-	<i>C. albicans</i>
		<i>C. tropicalis</i>	<b>32</b>	-	*
<b>6</b>	+	<i>C. tropicalis</i>	<b>33</b>	-	<i>C. albicans</i>
<b>7</b>	+	<i>C. albicans</i>			<i>C. glabrata</i>
		<i>C. tropicalis</i>	<b>34</b>	-	<i>C. albicans</i>
<b>8</b>	-	<i>C. albicans</i>			<i>C. tropicalis</i>
		<i>C. glabrata</i>	<b>35</b>	+	<i>C. glabrata</i>
<b>9</b>	+	<i>C. albicans</i>	<b>36</b>	-	*
		<i>C. glabrata</i>	<b>37</b>	+	<i>C. albicans</i>
<b>10</b>	+	<i>C. albicans</i>	<b>38</b>	-	<i>C. albicans</i>
		<i>C. tropicalis</i>	<b>39</b>	-	*
<b>11</b>	+	<i>C. albicans</i>	<b>40</b>	-	*
		<i>C. glabrata</i>	<b>41</b>	-	*
<b>12</b>	-	Outras spp.	<b>42</b>	-	*
<b>13</b>	-	<i>C. albicans</i>	<b>43</b>	-	<i>C. albicans</i>
		<i>C. tropicalis</i>	<b>44</b>	-	<i>C. albicans</i>
<b>14</b>	-	*			<i>C. glabrata</i>
<b>15</b>	-	<i>C. albicans</i>	<b>45</b>	-	*
		<i>C. glabrata</i>	<b>46</b>	-	<i>C. albicans</i>
<b>16</b>	-	<i>C. albicans</i>			<i>C. glabrata</i>
		<i>C. tropicalis</i>			<i>C. tropicalis</i>
<b>17</b>	-	<i>C. albicans</i>	<b>47</b>	-	*
<b>18</b>	-	*	<b>48</b>	-	<i>C. albicans</i>
<b>19</b>	-	<i>C. glabrata</i>	<b>49</b>	+	<i>C. albicans</i>
		<i>C. dubliniensis</i>			<i>C. tropicalis</i>
<b>20</b>	-	<i>C. albicans</i>	<b>50</b>	+	<i>C. albicans</i>
<b>21</b>	+	<i>C. albicans</i>	<b>51</b>	+	<i>C. albicans</i>
<b>22</b>	+	<i>C. tropicalis</i>	<b>52</b>	-	*
		<i>C. dubliniensis</i>	<b>53</b>	+	<i>C. tropicalis</i>
<b>23</b>	-	*			<i>C. dubliniensis</i>
<b>24</b>	-	*	<b>54</b>	+	<i>C. tropicalis</i>
<b>25</b>	+	<i>C. albicans</i>			<i>C. dubliniensis</i>
<b>26</b>	-	<i>C. tropicalis</i>	<b>55</b>	+	<i>C. albicans</i>
					<i>C. tropicalis</i>

Tabela A2: Contagem do biofilme em UFC/MI ( $\text{Log}_{10}$ ) de cepas de *C. albicans* e não-*albicans* em baseline e no teste de capacidade de formação de - Grupos experimental e controle.

N	Grupo	Espécies	Biofilme baseline UFC/mL	Formação do biofilme UFC/mL
1	+	<i>C. tropicalis</i>	4,48	10,75/10,51/10,92
		<i>C. dubliniensis</i>	3,60	8,74/10,84/10,63
2	+	<i>C. tropicalis</i>	3,41	8,60/10,54/7,70
3	+	*	*	*
4	+	<i>C. albicans</i>	1,60	8,66/8,76/8,48
5	+	<i>C. albicans</i>	2,95	8,92/8,81/8,72
		<i>C. tropicalis</i>	2,95	11,36/11,30/11,39
6	+	<i>C. tropicalis</i>	1,78	8,65/11,12/10,72
7	+	<i>C. albicans</i>	2,26	9,12/10,72/13,23
		<i>C. tropicalis</i>	2,26	8,80/8,62/8,88
8	-	<i>C. albicans</i>	6,78	10,57/8,81/8,53
		<i>C. glabrata</i>	6,78	8,72/8,54/8,81
9	+	<i>C. albicans</i>	3,12	10,26/8,59/8,58
		<i>C. glabrata</i>	3,21	8,93/8,75/8,72
10	+	<i>C. albicans</i>	5,78	10,85/10,65/10,73
		<i>C. tropicalis</i>	5,72	8,66/10,62/10,66
11	+	<i>C. albicans</i>	5,15	10,59/12,57/10,54
		<i>C. glabrata</i>	5,97	11,13/9,37/9,44
12	-	Outras spp.	6,05	10,69/10,48/10,59
13	-	<i>C. albicans</i>	4,60	11,20/12,60/12,63
		<i>C. tropicalis</i>	5,72	10,52/10,48/10,58
14	-	*	*	*
15	-	<i>C. albicans</i>	5,15	10,63/10,67/10,83
		<i>C. glabrata</i>	6,11	10,72/10,86/10,94
16	-	<i>C. albicans</i>	4,90	10,58/10,64/10,65
		<i>C. tropicalis</i>	4,59	10,69/8,85/11,40
17	-	<i>C. albicans</i>	2,30	8,88/8,61/8,43
18	-	*	*	*

Tabela A2: Continuação.

N	Grupo	Espécies	Biofilme baseline UFC/mL	Formação do biofilme UFC/mL
19	-	<i>C. glabrata</i>	2,78	8,20/6,89/6,78
		<i>C. dubliniensis</i>	5,81	8,00/5,78/10,99
20	-	<i>C. albicans</i>	5,15	10,76/12,89/10,78
21	+	<i>C. albicans</i>	4,51	12,60/12,81/12,58
22	+	<i>C. tropicalis</i>	4,92	8,53/8351/10,53
		<i>C. dubliniensis</i>	4,51	11,08/8,93/8,46
23	-	*	*	*
24	-	*	*	*
25	+	<i>C. albicans</i>	3,08	8,56/8,58/8,84
26	-	<i>C. tropicalis</i>	3,88	10,87/10,53/8,49
27	-	<i>C. glabrata</i>	3,31	8,85/8,73/9,04
28	+	<i>C. tropicalis</i>	2,60	10,90/10,59/10,90
29	-	<i>C. tropicalis</i>	3,13	8,53/10,78/8,70
		<i>C. dubliniensis</i>	2,00	11,52/10,58/8,66
30	-	<i>C. albicans</i>	4,30	8,73/8,53/8,34
31	-	<i>C. albicans</i>	3,00	10,84/8,73/11,08
32	-	*	*	*
33	-	<i>C. albicans</i>	2,98	10,52/8,95/8,92
		<i>C. glabrata</i>	5,33	10,90/10,65/10,95
34	-	<i>C. albicans</i>	2,90	10,66/10,83/8,91
		<i>C. tropicalis</i>	2,08	8,38/8,43/8,48
35	+	<i>C. glabrata</i>	2,38	8,86/11,05/10,54
36	-	*	*	*
37	+	<i>C. albicans</i>	4,60	10,78/8,76/12,65
38	-	<i>C. albicans</i>	2,56	8,82/8,81/8,65
39	-	*	*	*
40	-	*	*	*

Tabela A2: Continuação.

N	Grupo	Espécies	Biofilme baseline UFC/mL	Formação do biofilme UFC/mL
41	-	*	*	*
42	-	*	*	*
43	-	<i>C. albicans</i>	3,60	8,32/8,66/8,58
44	-	<i>C. albicans</i>	3,30	8,58/8,34/8,75
		<i>C. glabrata</i>	3,96	8,67/10,48/7,28
45	-	*	*	*
46	-	<i>C. albicans</i>	3,60	8,73/8,98/8,52
		<i>C. glabrata</i>	2,34	8,80/10,79/10,86
		<i>C. tropicalis</i>	1,78	10,98/11,01/10,63
47	-	*	*	*
48	-	<i>C. albicans</i>	2,30	12,86/10,89/11,02
49	+	<i>C. albicans</i>	2,30	10,53/12,81/12,63
		<i>C. tropicalis</i>	2,60	8,681/8,785/8,623
50	+	<i>C. albicans</i>	2,30	8,75/8,51/8,28
51	+	<i>C. albicans</i>	1,30	12,57/10,54/8,84
52	-	*	*	*
53	+	<i>C. tropicalis</i>	3,24	10,94/8,83/8,83
		<i>C. dubliniensis</i>	2,15	8,61/8,67/8,34
54	+	<i>C. tropicalis</i>	5,34	11,05/10,98/11,29
		<i>C. dubliniensis</i>	3,90	8,602/8,491/8,532
55	+	<i>C. albicans</i>	2,90	8,71/8,45/8,81
		<i>C. tropicalis</i>	3,85	10,64/8,94/10,64

Tabela A3: Resultados da avaliação do metabolismo celular das cepas de *Candida* spp. isoladas

N	Grupo	Espécies	Metabolismo celular	N	Grupo	Espécies	Metabolismo celular
1	+	<i>C. tropicalis</i>	1,330/1,375/1,222	21	+	<i>C. albicans</i>	0,862/0,907/1,065
		<i>C. dubliniensis</i>	1,240/0,873/1,175	22	+	<i>C. tropicalis</i>	1,612/1,248/1,223
2	+	<i>C. tropicalis</i>	1,016/1,144/1,107			<i>C. dubliniensis</i>	1,579/1,485/1,517
3	+	*	*	23	-	*	*
4	+	<i>C. albicans</i>	1,305/1,308/1,184	24	-	*	*
5	+	<i>C. albicans</i>	1,315/1,119/1,148	25	+	<i>C. albicans</i>	1,094/1,108/1,106
		<i>C. tropicalis</i>	1,175/1,127/1,190	26	-	<i>C. tropicalis</i>	1,684/1,216/1,303
6	+	<i>C. tropicalis</i>	1,370/1,207/1,211	27	-	<i>C. glabrata</i>	0,603/0,515/0,570
7	+	<i>C. albicans</i>	1,289/1,342/1,333	28	+	<i>C. tropicalis</i>	1,280/1,097/1,390
		<i>C. tropicalis</i>	1,153/1,058/1,079	29	-	<i>C. tropicalis</i>	1,238/1,175/1,132
8	-	<i>C. albicans</i>	1,479/1,227/1,506			<i>C. dubliniensis</i>	1,125/1,055/1,193
		<i>C. glabrata</i>	1,552/1,266/1,083	30	-	<i>C. albicans</i>	0,833/1,084/1,033
9	+	<i>C. albicans</i>	1,359/1,304/1,361	31	-	<i>C. albicans</i>	1,186/0,985/1,036
		<i>C. glabrata</i>	0,394/0,423/0,524	32	-	*	*
10	+	<i>C. albicans</i>	1,166/1,389/1,141	33	-	<i>C. albicans</i>	0,896/0,789/0,824
		<i>C. tropicalis</i>	0,886/0,925/1,084			<i>C. glabrata</i>	1,159/1,165/1,271
11	+	<i>C. albicans</i>	1,311/1,128/1,124	34	-	<i>C. albicans</i>	0,626/0,687/0,632
		<i>C. glabrata</i>	0,908/1,067/0,976			<i>C. tropicalis</i>	1,156/1,308/1,326
12	-	Outras spp.	1,679/1,402/1,180	35	+	<i>C. glabrata</i>	0,818/0,871/0,949
13	-	<i>C. albicans</i>	1,480/1,308/1,668	36	-	*	*
		<i>C. tropicalis</i>	1,064/1,014/1,018	37	+	<i>C. albicans</i>	0,864/0,841/0,844
14	-	*	*	38	-	<i>C. albicans</i>	0,873/0,928/0,980
15	-	<i>C. albicans</i>	1,272/1,301/1,220	39	-	*	*
		<i>C. glabrata</i>	1,634/1,206/1,195	40	-	*	*
16	-	<i>C. albicans</i>	1,347/1,021/1,041	41	-	*	*
		<i>C. tropicalis</i>	1,019/1,013/0,966	42	-	*	*
17	-	<i>C. albicans</i>	1,330/1,188/1,178	43	-	<i>C. albicans</i>	1,152/1,091/1,107
18	-	*	*	44	-	<i>C. albicans</i>	1,102/0,982/0,934
19	-	<i>C. glabrata</i>	1,306/1,234/1,009			<i>C. glabrata</i>	1,278/1,080/1,231
		<i>C. dubliniensis</i>	1,424/1,286/1,311	45	-	*	*
20	-	<i>C. albicans</i>	1,360/1,174/1,063				



Tabela A3: Continuação

N	Grupo	Espécies	Metabolismo celular
46	-	<i>C. albicans</i>	1,066/0,895/0,871
		<i>C. glabrata</i>	0,841/0,607/0,965
		<i>C. tropicalis</i>	0,989/1,062/0,923
47	-	*	*
48	-	<i>C. albicans</i>	0,928/1,034/1,114
49	+	<i>C. albicans</i>	1,101/1,099/1,039
		<i>C. tropicalis</i>	1,540/1,410/1,318
50	+	<i>C. albicans</i>	1,157/1,164/1,231
51	+	<i>C. albicans</i>	1,011/1,038/0,996
52	-	*	*
53	+	<i>C. tropicalis</i>	1,229/1,981/1,261
		<i>C. dubliniensis</i>	1,794/1,633/1,712
54	+	<i>C. tropicalis</i>	0,994/0,961/0,921
		<i>C. dubliniensis</i>	1,719/1,774/1,398
55	+	<i>C. albicans</i>	0,904/0,834/0,950
		<i>C. tropicalis</i>	0,825/0,605/1,079

Tabela A4: Dados completos da produção de fosfolipase (em mU) e proteinase (fluorescência) dos grupos de cepas no grupo experimental e controle

N	Grupo	Espécies	Fosfolipase (mu)	Proteinase (µg)
1	+	<i>C. tropicalis</i>	159,22	3,139
		<i>C. dubliniensis</i>	121,45	5,265
2	+	<i>C. tropicalis</i>	136,61	4,890
3	+	*	*	*
4	+	<i>C. albicans</i>	123,69	0
5	+	<i>C. albicans</i>	121,70	0
		<i>C. tropicalis</i>	120,10	2,922
6	+	<i>C. tropicalis</i>	128,45	3,460
7	+	<i>C. albicans</i>	127,25	0,547
		<i>C. tropicalis</i>	116,81	2,813
8	-	<i>C. albicans</i>	131,02	3,366
		<i>C. glabrata</i>	117,69	3,716
9	+	<i>C. albicans</i>	131,30	1,353
		<i>C. glabrata</i>	102,27	0,615
10	+	<i>C. albicans</i>	127,21	0,288
		<i>C. tropicalis</i>	108,26	4,786
11	+	<i>C. albicans</i>	117,31	1,171
		<i>C. glabrata</i>	130,49	0,113
12	-	Outras spp.	127,64	1,737
13	-	<i>C. albicans</i>	146,18	0,964
		<i>C. tropicalis</i>	123,42	3,961
14	-	*	*	*
15	-	<i>C. albicans</i>	123,72	1,436
		<i>C. glabrata</i>	128,96	0,133
16	-	<i>C. albicans</i>	123,23	1,994
		<i>C. tropicalis</i>	139,21	4,953
17	-	<i>C. albicans</i>	115,70	0
18	-	*	*	*
19	-	<i>C. glabrata</i>	120,11	0,360
		<i>C. dubliniensis</i>	126,23	3,532
20	-	<i>C. albicans</i>	143,06	2,974

Tabela A4: Continuação

N	Grupo	Espécies	Fosfolipase (mu)	Proteinase (µg)
21	+	<i>C. albicans</i>	120,91	0,398
22	+	<i>C. tropicalis</i>	146,16	4,839
		<i>C. dubliniensis</i>	138,56	1,063
23	-	*	*	*
24	-	*	*	*
25	+	<i>C. albicans</i>	119,135	0
26	-	<i>C. tropicalis</i>	123,25	3,182
27	-	<i>C. glabrata</i>	115,07	0,541
28	+	<i>C. tropicalis</i>	136,92	6,872
29	-	<i>C. tropicalis</i>	134,64	6,323
		<i>C. dubliniensis</i>	121,04	1,581
30	-	<i>C. albicans</i>	117,94	0
31	-	<i>C. albicans</i>	135,22	0,273
32	-	*	*	*
33	-	<i>C. albicans</i>	130,65	0,190
		<i>C. glabrata</i>	132,99	0,005
34	-	<i>C. albicans</i>	120,31	1,031
		<i>C. tropicalis</i>	145,36	2,952
35	+	<i>C. glabrata</i>	84,17	0
36	-	*	*	*
37	+	<i>C. albicans</i>	119,76	0
38	-	<i>C. albicans</i>	121,18	1,361
39	-	*	*	*
40	-	*	*	*
41	-	*	*	*
42	-	*	*	*
43	-	<i>C. albicans</i>	121,63	0
44	-	<i>C. albicans</i>	116,55	0
		<i>C. glabrata</i>	123,40	0,816
45	-	*	*	*
46	-	<i>C. albicans</i>	119,43	0
		<i>C. glabrata</i>	123,21	0
		<i>C. tropicalis</i>	124,60	5,825

Tabela A4: Continuação

<b>N</b>	<b>Grupo</b>	<b>Espécies</b>	<b>Fosfolipase (mu)</b>	<b>Proteinase (µg)</b>
<b>47</b>	-	*	*	*
<b>48</b>	-	<i>C. albicans</i>	123,85	1,531
<b>49</b>	+	<i>C. albicans</i>	124,14	0
		<i>C. tropicalis</i>	126,81	0,680
<b>50</b>	+	<i>C. albicans</i>	125,91	0
<b>51</b>	+	<i>C. albicans</i>	126,95	0
<b>52</b>	-	*	*	*
<b>53</b>	+	<i>C. tropicalis</i>	154,06	4,815
		<i>C. dubliniensis</i>	125,49	6,433
<b>54</b>	+	<i>C. tropicalis</i>	124,89	0,765
		<i>C. dubliniensis</i>	112,45	0,686
<b>55</b>	+	<i>C. albicans</i>	136,36	1,277
		<i>C. tropicalis</i>	124,21	6,317

Tabela A5: Avaliação da capacidade de produção de hifas por cepas de *Candida* spp.

N	Grupo	Espécies	Hifas (por mL)	N	Grupo	Espécies	Hifas (por mL)
1	+	<i>C. tropicalis</i>	740000	22	+	<i>C. tropicalis</i>	50000
		<i>C. dubliniensis</i>	860000			<i>C. dubliniensis</i>	80000
2	+	<i>C. tropicalis</i>	130000	23	-	*	*
3	+	*	*	24	-	*	*
4	+	<i>C. albicans</i>	380000	25	+	<i>C. albicans</i>	610000
5	+	<i>C. albicans</i>	450000	26	-	<i>C. tropicalis</i>	1335000
		<i>C. tropicalis</i>	670000	27	-	<i>C. glabrata</i>	*
6	+	<i>C. tropicalis</i>	910000	28	+	<i>C. tropicalis</i>	785000
7	+	<i>C. albicans</i>	425000	29	-	<i>C. tropicalis</i>	1160000
		<i>C. tropicalis</i>	160000			<i>C. dubliniensis</i>	435000
8	-	<i>C. albicans</i>	100000	30	-	<i>C. albicans</i>	590000
		<i>C. glabrata</i>	*	31	-	<i>C. albicans</i>	530000
9	+	<i>C. albicans</i>	415000	32	-	*	*
		<i>C. glabrata</i>	*	33	-	<i>C. albicans</i>	905000
10	+	<i>C. albicans</i>	460000			<i>C. glabrata</i>	*
		<i>C. tropicalis</i>	1215000	34	-	<i>C. albicans</i>	370000
11	+	<i>C. albicans</i>	280000			<i>C. tropicalis</i>	655000
		<i>C. glabrata</i>	*	35	+	<i>C. glabrata</i>	*
12	-	Outras spp.	195000	36	-	*	*
13	-	<i>C. albicans</i>	485000	37	+	<i>C. albicans</i>	440000
		<i>C. tropicalis</i>	540000	38	-	<i>C. albicans</i>	430000
14	-	*	*	39	-	*	*
15	-	<i>C. albicans</i>	275000	40	-	*	*
		<i>C. glabrata</i>	*	41	-	*	*
16	-	<i>C. albicans</i>	295000	42	-	*	*
		<i>C. tropicalis</i>	490000	43	-	<i>C. albicans</i>	330000
17	-	<i>C. albicans</i>	240000	44	-	<i>C. albicans</i>	420000
18	-	*	*			<i>C. glabrata</i>	*
19	-	<i>C. glabrata</i>	*	45	-	*	*
		<i>C. dubliniensis</i>	1840000	46	-	<i>C. albicans</i>	315000
20	-	<i>C. albicans</i>	695000			<i>C. glabrata</i>	*
21	+	<i>C. albicans</i>	560000			<i>C. tropicalis</i>	0

Tabela A5: Continuação

<b>N</b>	<b>Grupo</b>	<b>Espécies</b>	<b>Hifas (por mL)</b>
<b>47</b>	-	*	*
<b>48</b>	-	<i>C. albicans</i>	365000
<b>49</b>	+	<i>C. albicans</i>	170000
		<i>C. tropicalis</i>	165000
<b>50</b>	+	<i>C. albicans</i>	170000
<b>51</b>	+	<i>C. albicans</i>	570000
<b>52</b>	-	*	*
<b>53</b>	+	<i>C. tropicalis</i>	1165000
		<i>C. dubliniensis</i>	260000
<b>54</b>	+	<i>C. tropicalis</i>	365000
		<i>C. dubliniensis</i>	165000
<b>55</b>	+	<i>C. albicans</i>	730000
		<i>C. tropicalis</i>	180000