

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Centro de Ciência da Saúde
Faculdade de Odontologia
Departamento de Odontopediatria e Ortodontia

SENDA CHARONE

**PREVALÊNCIA DE *Candida* spp. ISOLADAS DE BIOFILME
DENTAL E SUA ASSOCIAÇÃO COM A DOENÇA CÁRIE EM
CRIANÇAS INFECTADAS PELO VÍRUS DA
IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV)**

Rio de Janeiro
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Centro de Ciência da Saúde
Faculdade de Odontologia
Departamento de Odontopediatria e Ortodontia

SENDA CHARONE

**PREVALÊNCIA DE *Candida* spp. ISOLADAS DE BIOFILME
DENTAL E SUA ASSOCIAÇÃO COM A DOENÇA CÁRIE EM
CRIANÇAS INFECTADAS PELO VÍRUS DA
IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Odontopediatria), Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Odontologia (Odontopediatria).

Orientadoras:

Prof. Dra. Gloria Fernanda Barbosa de Araújo Castro
Prof. Dra. Rosângela Maria de Araújo Soares

Rio de Janeiro

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Charone, Senda

Prevalência de *Candida* spp. isoladas de biofilme dental e sua associação com a doença cárie em crianças infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) / Senda Charone - Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Odontologia, 2009.

Orientadoras: Gloria Fernanda Barbosa de Araújo Castro e Rosangela Maria de Araújo Soares

Dissertação (Mestrado) – UFRJ / Faculdade de Odontologia, 2009.

Referência Bibliográfica: pag.69-80

1. *Candida* spp. 2. Criança. 3. Infecção pelo HIV. 4. Biofilme dental. 5. Doença cárie. Tese I. Castro, Gloria Fernanda Barbosa de Araújo Castro. II. Soares, Rosangela Maria de Araújo. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Odontopediatria). IV. Título Prevalência de *Candida* spp. isoladas de biofilme dental e sua associação com a doença cárie em crianças infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). V. Estudo clínico

FOLHA DE APROVAÇÃO

SENDA CHARONE

“PREVALÊNCIA DE CANDIDA SSP ISOLADA DE BIOFILME DENTÁRIO E SUA ASSOCIAÇÃO COM A DOENÇA CÁRIE EM CRIANÇAS INFECTADAS PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV)”

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Odontopediatria), Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Odontologia (Odontopediatria).

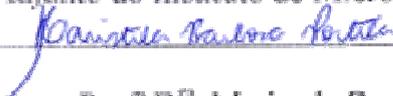
Rio de Janeiro, 27 de fevereiro de 2009.



Profª D^{ca}. Glória Fernanda Barbosa de Araújo Castro
DO-Prof. Adjunto do Deptº de Odontopediatria e Ortodontia-FO-UFRJ



Profª D^{ca}. Rosângela Maria de Araújo Soares
DO- Prof Adjunto do Instituto de Microbiologia - UFRJ



Profª D^{ca}. Maristela Barbosa Portela
DO-Prof. Assistente da Disciplina de pacientes Especiais e Cariologia da FO da Sociedade Pestalozzi do Rio de Janeiro



Profª D^{ca}. Lucianne Cople Maia
DO-Prof. Adjunto do Deptº de Odontopediatria e Ortodontia da FO-UFRJ



Profª D^{ca}. Apoena de Aguiar Ribeiro Lange
DO-Prof. Adjunto da FO-UFF

DEDICATÓRIA

Aos meus Pais Nagib Charone e Maria da Graça Pereira e aos meus irmãos Semel e Sader Charone, pelo incentivo, compreensão, companheirismo e amor incondicional durante minha árdua e vitoriosa caminhada. Dizer-lhes também, através de valoroso vocabulário que, não tenho medo da vida, tenho medo de não vivê-la, não há céu sem tempestade, nem caminhos sem acidentes, só é digno do pódio quem usa as derrotas para alcançá-lo. Sou uma sonhadora e por isso, dedico a realização do meu grande sonho às pessoas mais importantes da minha vida, VOCÊS.

A mais nova integrante da família, amor da minha vida, Suri, minha primeira sobrinha, a estrelinha mais linda que veio do céu para nos trazer muitas alegrias. A tia Senda te AMA MUITO!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus. Através da minha fé, de minhas orações, de meu amor, te agradeço Senhor por tudo que fui, que sou, que ainda serei e, principalmente, por nunca ter me deixado nos momentos mais difíceis da minha vida.

Aos **meus familiares** e, em especial minha **Avó Therezinha de Jesus Guimarães Pereira** meu grande exemplo de vida e minha irmã Semel, se anjo - da-guarda existe, hoje tenho certeza que você é o meu! Quanto tempo se passou, e durante todo percurso vocês estiveram presentes mesmo distantes. Amo vocês!

Às minhas Professoras, **Gloria Fernanda Castro** e **Rosangela Maria de Araújo Soares**, estimáveis orientadoras, que tanto contribuíram para minha formação de Mestre, dando exemplo de honestidade, justiça e amor. Dizer-lhes que tentei agir da melhor maneira possível, confidenciando-lhes principalmente meus medos durante tal caminhada. Sim, o medo de tamanha responsabilidade. Foram dois anos, não alguns minutos. Juntas, lutamos, erramos, recomeçamos, vibramos. Sacrificando seus sonhos em favor dos meus, vocês não foram apenas orientadoras, mas grandes amigas e companheiras. Hoje a realização deste sonho, dedico especialmente a vocês. Obrigada, por superar ao meu lado, minhas decepções e aplaudir minhas conquistas. Noites mal dormidas serão hoje esquecidas por mim, pois vejo que tudo valeu à pena. Minha eterna gratidão a vocês!

AGRADECIMENTOS

À Professora **Dra. Ivete Pomarico Ribeiro de Souza**, pelo acolhimento, incentivo, compreensão e ensinamento transmitido ao longo do Curso de Mestrado.

À querida amiga, **Maristela Portela**, meus eternos agradecimentos por todo ensinamento. A você dizer um muito obrigado não seria suficiente. Por isso dedico este poema “Que você seja um grande empreendedor. Ninguém é igual a você no palco da vida. Jamais desista das pessoas que ama. Jamais desista de ser feliz. Lute sempre pelos seus sonhos. Pois a vida é um espetáculo imperdível” (Augusto Cury). Você é um exemplo de profissionalismo e dedicação para todas as alunas que um dia fizeram ou farão parte desta linha de pesquisa. Expresso aqui minha grande admiração por você!

Aos **Professores do Departamento de Odontopediatria (FO/UFRJ)**, exemplos de profissionalismo, dedicação e carinho. Em especial, ao Professor Marcelo de Castro Costa, que me estendeu as mãos e me recebeu no início de minha morada na cidade e durante meu curso.

À Professora **Laura Primo**, pela oportunidade de fazer parte deste curso e pela confiança de me escolher como responsável pelo Projeto e Implantação do Banco de Dentes (FO/UFRJ). Expresso minha eterna admiração.

À Professora **Lucianne Cople Maia**. Naquele momento que você me estendeu a mão começou a ser escrita a história de minha grande conquista! Esta vitória não faria sentido sem seus ensinamentos. Perfeccionista, exigente, determinada, organizada, “Virginiana”. Não foi fácil pra mim, não é professora. Limitações, teimosias, cansaço, realização. O melhor de uma vitória não é vencer e sim descobrir que temos potenciais para atravessar qualquer obstáculo que venha a surgir durante nosso percurso. Muito obrigada, pelos votos de confiança!

Às Professoras **Suely Mendes Ribeiro e Dóris Kós Miranda (Belém/PA)**, recebam minha gratidão e reconhecimento de que nos méritos desta conquista há muito da presença de vocês. Em especial à Professora **Sonia Groisman** (Departamento de Odontologia Social/UFRJ), esteve sempre ao meu lado ao longo de minhas conquistas, sempre meiga, agradável e disposta a transmitir seus conhecimentos. Obrigada pelos votos sinceros de confiança e amizade.

Aos **funcionários do Departamento de Odontopediatria (FO/UFRJ)**, em especial Mere, Andréa, Gina, Kátia, Luiza, Robson, Zezé, Bruna, Isabel e João Carlos. Meus eternos agradecimentos, por todos os sorrisos e apoio recebido durante meu curso.

Aos **ex-alunos** do Departamento que tive a oportunidade de conhecer e conviver, Beatriz Neves, Patrícia Dias, Camilla, Fernanda Machado, Lizandra Ferrari, Lúcia Helena, Viviane de Paula, Glaucia Athayde, Luiz Cezar. Obrigada pela agradável convivência.

Às **Doutorandas**, Roberta Barcelos, Andréa, Ana Karla, Cristiana, em especial à Márcia Alves, Luciana Pomarico, Carla Martins, Viviane Pierro, sou eternamente grata pelo apoio incondicional em todos os momentos, sempre havia uma palavra de carinho para me confortar. Minha gratidão e admiração por vocês!

Tatiana Kelly, Rafael Pedro, em especial à **Marina**, companheira de longas horas de Projeto SIDA/AIDS (IPPMG), você foi um presente que surgiu para aliviar os momentos mais difíceis durante a realização deste trabalho. Muito obrigada pelo apoio até nos momentos em que eu estava errada. Adoro você “baxinha”!

Aos amigos de turma, **Ana Carolina, Maria Bárbara, Daniel Brito, Érika Kuchler, Patrícia Tannure, Raquel Pinheiro**. “Pode ser que um dia deixemos de nos falar. Pode ser que um dia o tempo passe, mas, se a amizade permanecer, um

do outro, se há, de lembrar” (*Albert Einstein*). Sentirei muitas saudades de todos os momentos juntos vividos! Adoro vocês!

À amiga **Madeleine Souza**. Foram muitos momentos juntos vividos. Momentos inacreditáveis, incontáveis, inesquecíveis. Em momento algum nos dividimos, mas nos reproduzimos, foi um acréscimo mútuo. Trocamos idéias, queríamos mudar o mundo e assim passaram-se 4 anos de amizade. Foi tão fácil compartilhar meu dia-dia com você, talvez porque eu tinha certeza que no final dos meus dias eu tinha alguém para me ouvir. Amigas para sempre!

Aos companheiros de **Laboratório da Professora Celuta Alviano e Rosangela Soares**. Pessoas mais que especiais. Sou eternamente grata pelo acolhimento, respeito, amizade e paciência para realização deste trabalho. Não poderia deixar de destacar uma pessoa especial, brilhante, inteligente, meu amigo e revisor particular de minha dissertação, que surgiu para me amparar nas horas intermináveis de Laboratório, **Alexandre Curvelo** meu grande amigo. Muito obrigada por compartilhar dia-a-dia a realização de meu grande sonho. Minha gratidão e admiração por você!

Aos **Funcionários, Júlio Ferreira e Nelson Souza Aguiar**, do Laboratório de Microscopia Ótica e Análise de Imagens (COPPE/UFRJ) pela extrema dedicação e disponibilidade no auxílio da realização das imagens de Microscopia de luz polarizada. Ao funcionário **Heleno**, sempre disponível para a realização das Imagens deste trabalho.

À equipe do ambulatório pediátrico SIDA/AIDS (IPPMG), em especial ao **Dr. Ricardo Hugo e Dra. Thalita** pelos ensinamentos e apoio incondicional para a realização deste trabalho.

Às alunas de **Iniciação Científica (FO/UFRJ) do Projeto SIDA/AIDS**, Natália, Barbara, Beatriz, Amanda, Flávia, obrigada pelo companheirismo, dedicação e apoio durante o Projeto.

Aos pacientes, da clinica da Disciplina de Odontopediatria e do Projeto SIDA/AIDS em Odontopediatria (FO/UFRJ), que fizeram parte deste trabalho. Exemplos de superação de vida! Esta foi, a melhor “lição” que aprendi durante o curso! Sentirei muitas saudades dos sorrisos mais sinceros que pude receber!

Ao **Professor Ronir Raggio Luiz**, sempre disponível durante a realização das análises estatísticas desta pesquisa. Expresso minha grande admiração pela simplicidade e paciência com seus alunos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-**CAPES** pelo financiamento desta pesquisa e de meu curso de Mestrado.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta dissertação, o meu sincero agradecimento!

Bons filhos conhecem o prefácio da história de seus pais. Bons jovens se preparam para o sucesso. Jovens brilhantes se preparam para as derrotas. Eles sabem que a vida é um contrato de risco e que não há caminhos sem acidentes. Bons jovens têm sonhos ou disciplina. Jovens brilhantes têm sonhos e disciplina. O destino não é inevitável, mas uma questão de escolha. Quem faz escolhas, escreve sua própria história, constrói seus próprios caminhos. Os sonhos não determinam o lugar onde vocês vão chegar, mas produzem a força necessária para tirá-los do lugar em que vocês estão. Sonhem com as estrelas para que possam pisar pelo menos na Lua. Sonhem com a Lua para que possam pisar pelo menos nos altos montes. Procure um grande amor na vida e cultivem-no. Pois, sem amor, a vida se torna um rio sem nascente, um mar sem ondas, uma história sem aventura!

Augusto Cury

RESUMO

CHARONE, Senda. **Prevalência de *Candida* spp. isoladas de biofilme dental e sua associação com a doença cárie em crianças infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV)** Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Odontologia, área de concentração em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

O objetivo do estudo foi identificar *Candida* spp. oriundas do biofilme dental supragengival de 50 crianças infectadas pelo HIV e avaliar sua relação com índice de biofilme, presença da doença cárie, imunossupressão e uso de HAART. Também analisou *in vitro* o potencial de desmineralização por *Candida* spp. no esmalte decíduo. As crianças deveriam apresentar biofilme supragengival espesso nas superfícies dentais. Para a sua coleta, utilizou-se curetas dentinárias nº20 estéreis friccionada sobre a superfície dental vestibular (cervical). Realizou-se exame para verificação da presença de manifestações bucais associadas à infecção pelo HIV e determinação dos índices de cárie, presença de manchas brancas ativas (MBA) e lesões ativas cavitadas em esmalte (CAE). Cento e quarenta (140) blocos de esmalte decíduo foram fixados em placas de 24-poços contendo meio de cultura YCB agar + 1% de BSA. Um total de 10 placas contendo 14 blocos cada, com a superfície do esmalte voltada para cima e o restante imerso completamente no meio de cultura, foram divididas em 6 Grupos: G1: biofilme de *C. albicans*; G2: biofilme de *C. albicans* e *C. tropicalis*; G3: biofilme de *C. albicans* e *C. parapsilosis*; G4: biofilme de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*; G5: biofilme de *C. albicans* (ATCC 24433); G6: ausência de biofilme. Suspensões celulares 10^5 de leveduras/mL cultivadas no mesmo meio de cultura (caldo) foram inoculadas. De cada placa, dois (2) blocos foram retirados no 1º, 3º, 5º, 8º, 10º, 12º e 15º dia após formação de biofilme. Realizou-se microdureza transversal (MDT) do esmalte através de um indentador Knoop com carga de 50 gramas por 15 segundos, e as imagens foram observadas através de Microscopia de Luz Polarizada. Todas as crianças apresentaram crescimento positivo (n=50, 100%) para *Candida* spp. A *C. albicans* foi a espécie mais prevalente (n=50, 100%), seguida por *C. parapsilosis*. Observou-se que quanto maior a quantidade de biofilme sobre as superfícies dentais, maior a quantidade de *Candida* spp. (p=0,048). Não foram observadas diferenças no número de ufc/mL de *Candida* spp. e *C. albicans* nas crianças com ou sem cárie (p>0,05). O mesmo também não foi observado entre imunossupressão e uso de HAART com a presença da levedura no biofilme. Observou-se uma diminuição significativa (p<0,05) dos valores de MDT do 1º ao 15º dia nas áreas de esmalte expostas ao biofilme, dos G1 ao G5; nas áreas de esmalte não-expostas, essa variação não foi significativa. Comparando os valores de MDT entre as áreas expostas e protegidas em cada um dos dias no G1, observou-se que à partir do 5º dia houve uma diferença significativa nos mesmos (p<0,05). As imagens de microscopia de luz polarizada dos fragmentos do G1 revelou lesões subsuperficiais indicando aumento da porosidade em relação a superfície aumentando no decorrer do experimento. Conclui-se que *Candida* spp. está presente no biofilme supragengival de crianças infectadas pelo HIV e estas espécies podem causar perda mineral do esmalte decíduo.

Palavras-chave: *Candida* spp., cárie, biofilme dental, criança, infecção pelo HIV.

ABSTRACT

CHARONE, Senda. **Prevalência de *Candida* spp. isoladas de biofilme dental e sua associação com a doença cárie em crianças infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV)**. Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Odontologia, área de concentração em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

The aim of this study was to identify the *Candida* spp. present in the supragingival dental biofilm of 50 children infected with HIV and to assess its relation with the index of biofilm, caries, immunosuppression and the use of HAART. *In vitro* demineralization potential of *Candida* spp. in primary enamel was analyzed. All the children should present thick supragingival biofilm in the dental surfaces. For the biofilm collect, sterile dentinary curettes number 20 were rubbed into the vestibular dental surface. Exams were performed in order to determine caries levels, the presence of active white spots, active cavitated lesions in enamel and to verify the presence of oral manifestations associated to HIV infection. One hundred forty (140) dental fragments presenting primary enamel were fixed in 24-well plates filled with YCB agar medium supplemented with BSA (1%). The fragment, except the enamel surface, was immersed in the culture medium. 10 plaques, containing 14 fragments each, were divided into 6 groups. They are: G1 - *C. albicans* biofilm; G2 - *C. albicans* and *C. tropicalis* biofilm; G3 - *C. albicans* and *C. parapsilosis* biofilm; G4 - *C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. glabrata* biofilm; G5 - *C. albicans* biofilm (ATCC 24433); G6 - no biofilm (medium control). Cell suspensions in the concentration of 10^5 yeast/mL cultivated in the same culture medium were inoculated. Two fragments from each plate were removed on the 1st, 3rd, 5th, 8th, 10th, 12th and 15th day after the biofilm formation. Enamel Cross Sectional Microhardness (CSMH) was performed by using Knoop indenter with the charge of 50 grams during 15 seconds. The images were observed through Polarized Light Microscopy. All the children presented positive growth (n=50/100%) to *Candida* spp. *C. albicans* was the most prevalent specie (n=50/100%), followed by *C. parapsilosis*. As large the biofilm amount among the dental surfaces, the presence of *Candida* spp. (p=0.048) was higher. Differences in the concentration of cfu/mL of *Candida* spp. and *C. albicans* in caries free children and those who presented caries (p>0.05) were not found. The same was not observed in immunosuppression and the use of HAART with the presence of yeast in the biofilm. A significant gradual decrease (p<0.05) of CSMH in the enamel areas exposed to the biofilm was observed from the 1st to the 15th day in G1 - G5. In the non-exposed enamel areas, this variation was not significant. By comparing CSMH values of the exposed and protected areas in G1 during all the days, a significant difference (p<0.05) was observed in the 5th day on. One could conclude that *Candida* spp. is present in the supragingival biofilm of HIV infected children and that these species may cause mineral loss in the primary enamel.

Key words: *Candida* spp., caries, dental biofilm, child, HIV-infection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO 1	15
Graph 1: Perceptual microhardness reduction in permanent blocks on the different days	26
ARTIGO 2	27
Quadro 1: Representação esquemática dos diferentes índices de biofilme (RIBEIRO <i>et al.</i> ,2002)	52
Figura 1: Perda mineral (concentração de íons cálcio $\mu\text{g/mL}$ liberado na suspensão) durante a formação de biofilme por <i>C. albicans in vitro</i> nos diferentes dias.....	56
Figura 2: Imagens de MLP dos blocos de esmalte do Grupo 1. As imagens A, C, E, G, são as áreas de esmalte expostas ao biofilme de <i>C. albicans</i> no 1º, 5º, 8º e 15º dia respectivamente. As imagens B, D, F, H, representam os respectivos controles (áreas não-expostas ao biofilme).....	57

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1	15
Table 1: Cross-sectional microhardness (CSMH) values in enamel permanent teeth	26
ARTIGO 2	29
Tabela 1: Condições sistêmicas dos pacientes infectados pelo HIV (n=50) de acordo com critério CDC (1994).....	52
Tabela 2: Distribuição das crianças de acordo com as espécies de <i>Candida</i> isoladas e sua e a classificação quanto ao número de ufc/mL	53
Tabela 3: Relação entre a média de ufc/mL de <i>Candida</i> spp. isoladas do biofilme de crianças infectadas pelo HIV e o índice de biofilme	53
Tabela 4: Relação entre o número de ufc/mL de <i>Candida</i> spp. e <i>C. albicans</i> e presença da doença cárie	54
Tabela 5: Relação entre o número de manchas brancas ativas e cavidades ativas em esmalte e classificação do crescimento de <i>Candida</i> spp. Isoladas do biofilme ..	54
Tabela 6: Valores médios de MDT do esmalte decíduo de acordo com os grupos e tempo de experimento. Grupo 1: biofilme formado por <i>C. albicans</i> ; Grupo 2: biofilme misto (<i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i>); Grupo 3: biofilme misto (<i>C. albicans</i> e <i>C. parapsilosis</i>); Grupo 4: biofilme misto (<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> e <i>C. glabrata</i>); Grupo 5: biofilme formado por <i>C. albicans</i> (ATCC 24433); Grupo 6: ausência de biofilme de <i>Candida</i> (controle do meio)	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- CAD – cavitação ativa em dentina
- CD4 - Linfócitos CD4
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention
- HAART - Highly Active Antiretroviral Therapy
- HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana
- IgA - Imunoglobulina A
- IPPMG - Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira
- M - Mucosa bucal
- mL - mililitro
- µL - microlitros
- Saps - Aspártico-proteases secretadas
- MBA - Mancha branca ativa
- CAE – cavitação ativa em esmalte
- UFC - Unidade Formadora de Colônias
- UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro
- FO – Faculdade de Odontologia
- M – oral mucosa
- DCL – Dentin carious Lesion
- CSMH – cross-sectional microhardness
- NaCl – solução salina
- mm – milímetro
- HNO³ – Acido Nítrico
- MDT – Microdureza transversal
- Ca⁺² – Cálcio
- YCB - Yeast Carbon Base
- BSA - bovine serum albumin

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	PROPOSIÇÃO	6
3.	DELINEAMENTO DA PESQUISA	7
4.	ARTIGOS REALIZADOS	14
4.1	Artigo 1	15
4.2	Artigo 2	27
5.	DISCUSSÃO	59
6.	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
	ANEXOS.....	81

1. INTRODUÇÃO

As manifestações bucais tem sido relatadas como sendo os primeiros indicadores da infecção pelo HIV (SANTOS *et al.*, 2001; NAIDOO & CHIKTE, 2004; COOGAN *et al.*, 2005; HODGSON *et al.*, 2006a), estando diretamente relacionadas com o grau de imunossupressão do paciente (CHIGURUPATI *et al.*, 1996; COOGAN *et al.*, 2005; CHALLACOMBE *et al.*, 2006; HODGSON *et al.*, 2006a; MIZIARA *et al.*, 2006). Além disto, também podem estar associadas ao uso de medicamentos e hábitos de higiene bucais (KERDPON *et al.*, 2004). As lesões bucais encontradas com maior freqüência em pacientes pediátricos infectados pelo HIV são: candidíase bucal, estomatite herpética, eritema linear gengival, hipertrofia das parótidas e úlceras aftosas (CHIGURUPATI *et al.*, 1996; CASTRO, 1998; RAMOS-GOMEZ *et al.*, 1999; PORTELA *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2001; SOARES *et al.*, 2004; FREZZINI *et al.*, 2005). Lesões fortemente associadas à infecção pelo HIV como, por exemplo, Sarcoma de Kaposi, Linfoma não-Hodgkin e Leucoplasia Pilosa, são consideradas raras em crianças (RAMOS-GOMEZ *et al.*, 1999; COOGAN *et al.*, 2005; FREZZINI *et al.*, 2005; HODGSON *et al.*, 2006a). De todas as lesões, a candidíase bucal é a lesão de maior prevalência em pacientes pediátricos infectados pelo HIV, possuindo alto valor preditivo para a evolução da mesma (CASTRO, 1998; PORTELA *et al.*, 2000, RIBEIRO, 2000; JABRA-RIZK *et al.*, 2000; PONGSIRIWET *et al.*, 2004; FREZZINI *et al.*, 2005; CHALLACOMBE *et al.*, 2006; HODGSON *et al.*, 2006a; CERQUEIRA *et al.*, 2007). Estudos demonstram que sua prevalência varia de 20 a 83,3% nestes pacientes (CHIGURUPATI *et al.*, 1996; RAMOS-GOMEZ *et al.*, 1999; SANTOS *et al.*, 2001; NAIDOO & CHIKTE, 2004; FREZZINI *et al.*, 2005).

A *Candida albicans* é o agente etiológico mais freqüentemente encontrado em lesões de candidíase bucal (NICOLATOU-GALITIS *et al.*, 2004; PONGSIRIWET *et al.*, 2004; PORTELA *et al.*, 2004; RUIZ EXTREMERA *et al.*, 2000; CERQUEIRA *et al.*, 2007), ocorrendo como um microrganismo comensal na cavidade bucal dos indivíduos (GREENSPAN & GREENSPAN, 1993; SWEET, 1997; SÁNCHEZ *et al.*, 2001; NAGLIK *et al.*, 2003; HOSSAIN *et al.*, 2003; PONGSIRIWET *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2006). Entretanto, em pacientes imunocomprometidos, este microrganismo pode assumir características diferenciais de patogenicidade originando a candidíase bucal como infecção oportunista (STARR *et al.*, 2002; NAGLIK *et al.*, 2003; PONGSIRIWET *et al.*, 2004). Evidencia-se também a presença de outras espécies de *Candida* com características patogênicas causadoras de infecções fúngicas como a *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. stellatoidea* (SÁNCHEZ, *et al.*, 2001; CHENG *et al.*, 2005; RICHARDSON, 2005) e *C. dubliniensis* (SULLIVAN *et al.*, 1995; SULLIVAN & COLEMAN, 1997; PORTELA *et al.*, 2004; FREZZINI *et al.*, 2005).

A infecção pelo HIV tem sido apontada como um fator predisponente para a colonização por espécies de *Candida* na cavidade bucal. Estudos demonstraram maior prevalência destes microrganismos em crianças infectadas (CASTRO *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2001) além de que, foi observada forte associação entre a prevalência de isolados de *Candida* spp. e o subsequente declínio da taxa de CD4 (HICKS *et al.*, 1998; BOSCO *et al.*, 2003). Pode-se concluir, portanto, que tais microrganismos estão mais freqüentemente colonizados na cavidade bucal de pacientes imunocomprometidos (JABRA-HIZK *et al.*, 2000; BOSCO *et al.*, 2003; COSTA *et al.*, 2003). Estudos apontam que a terapia antiretroviral combinada com drogas inibidoras de proteases (Highly Active Antiretroviral Therapy/HAART)

utilizadas em pacientes infectados pelo HIV, apresenta um efeito indireto sobre as lesões bucais, principalmente a candidíase bucal, diminuindo a prevalência das mesmas (FREZZINI *et al.*, 2005; HODGSON *et al.*, 2006b; YANG *et al.*, 2006). Além de induzir uma acelerada melhora das funções imunológicas do paciente com aumento dos níveis de linfócitos T CD4, tornando-os menos susceptíveis às infecções oportunistas (EYESON *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2001; NICOLATOU-GALITIS *et al.*, 2004; FREZZINI *et al.*, 2005), estes inibidores de proteases podem atuar nas aspártico-proteases secretadas (Saps), uma classe de protease expressa por espécies de *Candida*, envolvidas no processo de adesão e penetração na célula do hospedeiro (ZEPPELIN *et al.*, 1999; BARCHIESI *et al.*, 2002; CASSONE *et al.*, 2002; HODGSON *et al.*, 2006b).

Além das manifestações em tecidos moles, crianças infectadas pelo HIV apresentam também maior prevalência da doença cárie quando comparadas às não-infectadas (CASTRO *et al.*, 2004; HODGSON *et al.*, 2006b; CERQUEIRA *et al.*, 2007). Fato este possivelmente resultante de uma dieta hipercalórica, alto teor de sacarose presente nos medicamentos ingeridos (GREENSPAN & GREENSPAN, 1994, POMARICO *et al.*, 2008), imunossupressão devido a progressão da infecção pelo HIV e higiene bucal deficiente (ELDRIDGE & GALLAGHER, 2000; CASTRO *et al.*, 2004; FREZZINI *et al.*, 2005).

A associação entre a presença de *Candida* spp. na cavidade bucal e a cárie dentária tem sido relatada na literatura por vários autores (SZIEGOLEIT *et al.*, 1999; AKDENIZ, 2002; REGO *et al.*, 2003). Alguns estudos mostram que a *C. albicans* foi mais prevalente em biofilme dental e saliva de crianças cárie-ativas do que em crianças livres de cárie (RADFORD *et al.*, 2000; MOALIC *et al.*, 2001) levando os

autores a questionar sobre a possível participação desta levedura no desenvolvimento do processo carioso. Já NISHIMURA *et al.* (2002) relataram que a *C. albicans* possui propriedades colagenolíticas e a exposição de colágeno da dentina e da superfície radicular possibilita a aderência local deste microrganismo e sua persistência sobre a superfície dentária da hidroxiapatita dissolvida. CERQUEIRA *et al.* (2007) em um estudo comparativo entre crianças infectadas pelo HIV e crianças saudáveis também observaram uma maior prevalência de espécies de *Candida* nas crianças infectadas com a presença de lesões cariosas cavitadas em dentina.

Além disso, a coagregação de leveduras e bactérias bucais também tem sido relatada. NIKAWA *et al.* (2001) avaliou a coagregação de *C. albicans* associada a bactérias bucais em meio de cultura suplementado com glicose. Segundo os autores, esta coagregação pode ser considerada como sendo um fator de extrema relevância na ecologia de biofilmes bucais, e a presença de açúcares alterando a coaderência da levedura pode contribuir para sua sobrevivência e manutenção sobre as diferentes superfícies da cavidade bucal. Além da coagregação, estudos já identificaram e caracterizaram as moléculas responsáveis por esta interação (JENKINSON *et al.*, 1990; HOLMES *et al.*, 1995, 1996). Ainda, NIKAWA *et al.* (2003), observaram a coaderência de *C. albicans* associada aos estreptococos bucais, especialmente *S. mutans* e avaliaram também o potencial cariogênico da *C. albicans*. Após comparar a habilidade desta levedura em dissolver a hidroxiapatita, concluiu que embora os dois microrganismos tenham capacidade de dissolver hidroxiapatita, o *S. mutans* foi mais eficiente. Os autores também observaram alta afinidade da *C. albicans* para aderir à hidroxiapatita e sugeriram que o seu potencial cariogênico reside no seu mecanismo de aderência sobre a hidroxiapatita,

provavelmente proporcionado por interações eletrostáticas entre a levedura e a superfície sólida (NIKAWA *et al.*, 1989; NIKAWA *et al.*, 1992).

Diante do exposto, devido à importância do controle da doença cárie em crianças infectadas pelo HIV e o possível envolvimento coadjuvante da *Candida* no processo carioso, o presente estudo propõe a análise da colonização de *Candida* spp. no biofilme supragengival de crianças infectadas pelo HIV, bem como a análise *in vitro* do potencial de desmineralização destas leveduras no esmalte dental.

2. PROPOSIÇÃO

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a relação entre espécies de *Candida* isoladas do biofilme dental supragengival de pacientes infantis infectados pelo HIV e a doença cárie.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Isolar, identificar e quantificar espécies de *Candida* oriundas do biofilme dental supragengival de pacientes infantis infectados pelo HIV;

2.2.2 Avaliar a relação de *Candida* spp. isoladas do biofilme dental supragengival de pacientes infantis infectados pelo HIV com o índice de biofilme, com a presença da doença cárie, imunossupressão e uso de HAART;

2.2.3 Avaliar *in vitro* o potencial de desmineralização por *Candida* spp. isoladas de biofilme dental de crianças infectadas pelo HIV no esmalte de dentes decíduos e permanentes através de microdureza transversal e microscopia de luz polarizada.

3. DELINEAMENTO DA PESQUISA

O presente estudo se caracterizou como uma pesquisa de caráter descritivo e analítico sobre a prevalência de *Candida* spp. isoladas do biofilme dental supragengival de pacientes infantis infectados pelo HIV, considerando os aspectos quantitativos e qualitativos, bem como, as associações propostas pelo estudo.

Esta pesquisa teve a aprovação pelo Comitê de Ética Local do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira da Universidade Federal do Rio de Janeiro, na cidade do Rio de Janeiro, Brasil (IPPMG/UFRJ) (Anexo 1, pag. 80).

O universo amostral foi compreendido pelos pacientes pediátricos com diagnóstico definitivo para infecção pelo HIV conforme critério adotado pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, 1994), provenientes de uma coorte de crianças infectadas pelo HIV, que fazem parte do Serviço de AIDS Pediátrica do IPPMG/UFRJ e, acompanhados pelo Projeto SIDA/AIDS em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (FO/UFRJ). A seleção da amostra adotou procedimentos por conveniência no Serviço de AIDS Pediátrica do IPPMG, a partir do recrutamento de pacientes infantis no período de oito meses (agosto de 2007 à março de 2008). Após obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), devidamente assinado pelo responsável legal da criança e anuência da mesma (Anexo 2, pag. 81), a amostra final foi constituída por cinquenta (50) crianças na faixa etária de 3 a 12 anos de idade.

A partir dos resultados da presente pesquisa, foram elaborados dois artigos científicos descrevendo a metodologia empregada e os resultados obtidos.

O primeiro artigo objetivou analisar *in vitro* o potencial de desmineralização de isolados clínicos de *C. albicans* isolada da mucosa bucal (M) e de lesões cariosas cavitadas em dentina (CAD) de uma criança infectada pelo HIV sobre o esmalte de dentes permanentes. Para a realização deste estudo, foram selecionados um (1) isolado de *C. albicans* oriundo da M e um (1) isolado oriundo de CAD, que vem sendo estocadas e mantidas em tubos de rosca contendo 5 mL de meio agar Sabouraud dextrose estéril a 4°C, no Laboratório de Biologia de Protistas do Instituto de Microbiologia Geral Professor Paulo Góes (Departamento de Microbiologia Geral) da UFRJ.

A seleção e o preparo dos blocos dentais de esmalte foram realizados no Laboratório do Departamento de Odontopediatria da FO/UFRJ. Utilizaram-se dez (10) molares permanentes doados por pacientes da clínica de Cirurgia da FO/UFRJ. Todos estavam hígidos, sem quaisquer alterações visíveis ao microscópio óptico (40x, Astro Optics Division, Montpelier, USA) em sua face vestibular ou lingual. Posteriormente a seleção dos dentes, realizou-se o corte dos mesmos por meio de disco diamantado dupla-face em peça reta em baixa rotação, originando trinta e seis (36) blocos dentais de esmalte de tamanhos de 5 x 5 x 2 mm. Em seguida, os blocos de esmalte foram limpos com água e pedra pomes e todas as superfícies dos blocos foram protegidas com esmalte cosmético de cor vermelho (2 revestimentos, 24 horas de secagem), exceto para uma área circular de 6,06 mm², confeccionada no centro da área exposta de cada bloco de esmalte. Para formação de biofilme de *C. albicans*, realizada no Laboratório de Biologia de Protistas do Instituto de Microbiologia Geral Professor Paulo Góes (Departamento de Microbiologia Geral) da UFRJ, os blocos de esmalte previamente preparados e autoclavados por 15 minutos à 121°C (AMAECCHI *et al.*, 1998), foram fixados em placas *Petri* contendo meio de

cultura YCB agar (Yeast Carbon Base, Difco, Bacto), suplementado com 1% de BSA (Bovine Serum Albumin). Um total de três (3) placas contendo doze (12) blocos dentais cada, com a superfície do esmalte voltada para cima e o restante imerso completamente no meio de cultura (Figura 1 - Anexo 3, pag. 82), foram divididas em três grupos: Grupo 1 - biofilme formado por *C. albicans* isolada da M; Grupo 2 - biofilme formado por *C. albicans* isolada de CAD e Grupo 3 - ausência de biofilme (sistema controle do meio). Suspensões celulares padronizadas com 10^5 de leveduras/mL cultivadas em meio de cultura YCB caldo suplementado com 1% de BSA, sob agitação por 48 horas à 37°C, foram inoculadas em cada placa, exceto para placa controle que continha os blocos dentais imersos apenas em 1 mL de meio de cultura YCB suplementado com 1% de BSA. A formação de biofilme realizada de acordo com a metodologia descrita por MACHADO (2007) modificada pelo uso de dentes humanos ocorreu após a incubação das placas à 37°C. Três (3) blocos dentais foram removidos a partir do 3º, 5º, 8º e 10º dia de incubação e formação de biofilme. Posteriormente à formação de biofilme, todos os blocos de esmalte foram novamente autoclavados e limpos com uma escova macia e água corrente e, cortados na sua região equatorial (MORAES, 1998) para análise de Microdureza Knoop (50g, 15s) (CRAIG *et al.*, 1958; FEATHERSTONE *et al.*, 1983) realizada no laboratório de Ensaios Mecânicos do Instituto Militar de Engenharia do Rio de Janeiro (IME/RJ).

O segundo artigo objetivou determinar a prevalência de espécies de *Candida* isoladas do biofilme dental supragengival de pacientes infantis infectados pelo HIV, relacionando-a com a presença da doença cárie, imunossupressão e uso de HAART. Em seguida avaliou-se *in vitro* o potencial de desmineralização por *Candida* spp. isoladas do biofilme dental sobre o esmalte de dentes decíduo. A amostra foi

constituída de cinquenta (50) pacientes na faixa etária de 3 a 12 anos, com diagnóstico definitivo para infecção pelo HIV (CDC, 1994) e com a presença de biofilme supragengival espesso nas superfícies dentais de acordo com índice proposto por RIBEIRO *et al.*,(2002).

Foram realizados exames extra e intraorais, por um único examinador previamente calibrado (S.C) (Kappa inter examinador= 0,74), para a verificação da presença de manifestações bucais e obtenção dos índices de biofilme (RIBEIRO *et al.*,2002), índices de cárie (OMS, 1987) e presença de mancha branca ativa (MBA) e lesões cavitadas em esmalte (CAE) de acordo com critérios estabelecidos por BJORN DAL *et al.* (1997) e CARVALHO *et al.* (1992). A história médica (classificação clínica e imunológica da doença, diagnóstico de AIDS, tipo de transmissão, uso de medicamentos antiretrovirais) e os exames laboratoriais (CD4%, CD8%, relação CD4/CD8, carga viral) mais recentes, colhidos até três meses antes ou após o exame bucal, foram obtidos através dos prontuários médicos dos respectivos pacientes (Anexo 4, pag. 83).

Para a coleta dos espécimes clínicos (biofilme supragengival espesso), também por um único examinador, utilizou-se curetas dentinárias nº20 (Duflex[®]) estéreis, sobre a superfície dentária vestibular (região cervical), até que a mesma permanecesse completamente preenchida. Em seguida, este material coletado foi transferido para tubos *ependorffs* estéreis, contendo 1 mL de NaCl (0,85%) mantidos sob refrigeração e transportados para o Laboratório de Biologia de Protistas do Instituto de Microbiologia Geral Professor Paulo Góes (Departamento de Microbiologia Geral) da UFRJ, para subseqüentes análises. A identificação e quantificação presuntiva das espécies de *Candida* foi realizada por meio da coloração das colônias reveladas no meio de cultura CHROMagar *Candida*[®], de

acordo com as instruções do fabricante e as de ODDS & BERNAERTS (1994). Os tubos *ependorffs* contendo os espécimes clínicos foram homogeneizados (vórtex) por 30 segundos e em seguida as suspensões foram diluídas na proporção de 1:1 em NaCl (0,85%) estéril. A partir desta diluição, 100 µL de cada suspensão foram semeados em placas *Petri* contendo meio de cultura CHROMagar *Candida*[®] (Anexo 5, pag. 87). As placas permaneceram incubadas por 48 e 72 horas em estufa à 37°C. Para identificação definitiva das espécies de *Candida*, utilizou-se testes bioquímicos de fermentação e assimilação de açúcares através do sistema API 20C (Biomerieux, Marcy L'Etoile, France) e as reações lidas após 48 e 72 horas à 37°C (Anexo 6, pag. 88).

Para a análise *in vitro* do potencial de desmineralização por *Candida* spp. isoladas do biofilme dental sobre o esmalte de dentes decíduo, foram utilizados neste estudo sessenta (60) molares decíduos exfoliados, hígidos, sem quaisquer alterações visíveis ao microscópio óptico (40x, Astro Optics Division, Montpellier, USA) em sua face vestibular ou lingual, doados por pacientes infantis pertencentes a Clínica de Odontopediatria da FO/UFRJ (Anexo 7, pag. 89). Realizou-se o preparo e corte dos mesmos, similar ao descrito na metodologia do primeiro artigo, originando um total de cento e quarenta (140) blocos de esmalte decíduo (5 x 5 x 2 mm), obtidos do terço médio da superfície vestibular ou lingual. Em seguida, os blocos de esmalte foram limpos com água e pedra pomes e, todas as superfícies dos blocos foram protegidas com esmalte cosmético de cor vermelho (2 revestimentos, 24 horas de secagem) exceto para uma área circular de 6,06 mm², confeccionada no centro da área exposta de cada bloco de esmalte. Para formação de biofilme, foram selecionados aleatoriamente cinco (5) isolados de *C. albicans* oriundas do biofilme dental de cinco (5) pacientes diferentes e isolados de *C. albicans* e não-*albicans* de

pacientes que apresentaram simultaneamente os seguintes isolados: um (1) com *C. albicans* e *C. parapsilosis* simultaneamente; um (1) com *C. albicans* e *C. tropicalis*; um (1) com *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* e, um (1) isolado referência composto por cepas derivadas do *American Type Culture Collection* (ATCC) representada por *C. albicans* (ATCC 24433). Os blocos dentais de esmalte decíduos foram autoclavados por 15 minutos a 121°C (AMAECHEI *et al.*, 1998) e fixados em placas de 24-poços contendo meio de cultura YCB agar (Yeast Carbon Base, Difco, Bacto), suplementado com 1% de BSA (Bovine Serum Albumin). Um total de 10 placas de 24-poços continha quatorze (14) blocos dentais, com a superfície de esmalte voltada para cima e o restante imerso completamente no meio de cultura. Suspensões celulares padronizadas com 10^5 de leveduras/mL cultivadas em meio de cultura YCB caldo suplementado com 1% de BSA sob agitação por 48 horas à 37°C, foram inoculadas em cada poço da placa, exceto para placa controle que continha os blocos dentais imersos apenas em 1 mL de meio de cultura YCB + 1% de BSA. A formação de biofilme realizada de acordo com a metodologia descrita por MACHADO (2007) modificada ocorreu após a incubação das placas à 37°C. De cada placa, dois (2) blocos dentais foram retirados no 1º, 3º, 5º, 8º, 10º, 12º e 15º dia após formação de biofilme. Ao longo do experimento foi realizada a verificação da viabilidade celular das leveduras em suspensão através do teste de exclusão do corante azul de Trypan (PATTERSON, 1979) e a determinação da concentração de íons cálcio (Ca^{+2}) liberados pelos blocos de esmalte decíduo para a suspensão (meio de cultura), através de um Espectrofotômetro de Absorção Atômica (CONTRAA 300, ANALYTIK JENA; ar-chama/óxido nítrico) no Laboratório de Química Analítica - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC/RJ). A metodologia empregada foi de acordo com TEN CATE *et al.* (2008) modificada.

Após o experimento, todos os blocos de esmalte decíduos foram autoclavados e limpos com uma escova macia e água corrente, e longitudinalmente seccionados na sua região equatorial utilizando-se um disco diamantado dupla-face, acoplado a uma cortadeira elétrica (BUEHLER, ISOMET) para o ensaio de Microdureza Knoop (50g, 15s) (CRAIG *et al.*, 1958; FEATHERSTONE *et al.*, 1983) realizada no Laboratório de Ensaio Mecânicos do Instituto Militar de Engenharia (IME/RJ). Após análise da microdureza do esmalte, as amostras foram observadas por Microscopia de Luz Polarizada sob um aumento de 100x (CARLSTRÖM, 1964) realizada na Escola Politécnica de Engenharia Metalúrgica e de Materiais (COPPE/UFRJ).

Mais detalhes sobre a metodologia empregada e os resultados obtidos encontram-se nos referidos artigos desta dissertação (artigo 1 – pag. 15; artigo 2 – pag. 29).

4. ARTIGOS REALIZADOS

Artigo 1 - “*In vitro* enamel demineralization by *Candida albicans* isolated from different oral cavity sites of a HIV-infected child”.

Artigo 2 – “*Candida* spp. isoladas do biofilme supragengival de crianças infectadas pelo HIV, sua associação com a doença cárie e seu potencial (*In vitro*) de desmineralização”.

4.1 Artigo 1

***In vitro* enamel demineralization by *Candida albicans* isolated from different oral cavity sites of a HIV-infected child**

Senda Charone¹
Rosangela Maria de Araújo Soares²
Madeleine Souza das Chagas¹
Maristela Barbosa Portela¹
Ivete Pomarico Ribeiro de Souza¹
Gloria Fernanda Barbosa de Araújo Castro¹

¹*Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil*

²*Department of Microbiology; Institute of Microbiology Professor Paulo de Góes, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil*

ABSTRACT

The *in vitro* potential of *C. albicans* to demineralize enamel was analyzed. Two isolates of *C. albicans* were selected, from the oral mucosa (M) and from a dentin carious lesion (D), both from the same HIV-infected pediatric patient. Thirty-six permanent enamel blocks were fixed in *Petri* plates with agar medium with the exposed enamel surface facing upwards. Three groups were formed as follow: G1 - exposed to biofilm formed by *C. albicans* from the M; G2 – exposed to biofilm formed by *C. albicans* from the D; and G3 with no biofilm formation. Blocks from each group were removed on the 3rd, 5th, 8th and 10th day after biofilm formation. The surface cross-sectional microhardness (CSMH) of all blocks, in the enamel areas exposed and non-exposed to biofilm were measured with a Knoop diamond indenter. The CSMH decreased in G1 and G2. In G1, significant decrease in CSMH of the exposed enamel occurred only after the 5th day of biofilm formation in comparison to the non-exposed enamel). In G2, this difference occurred on the 3rd day. The mean perceptual reduction in microhardness was lower for the control medium system (G3) and was similar for G1 and G2. We suggest that *C. albicans* are able to demineralize enamel surfaces in permanent teeth.

Key words: *Candida albicans*, demineralization, dental enamel, HIV infection, children

INTRODUCTION

Yeasts are opportunistic pathogens that can cause infections under environmentally favorable conditions such as immune suppression seen with HIV-infected patients¹⁻³ and *Candida albicans* is the most common opportunistic pathogen found in the oral cavity of HIV-infected children.¹⁻⁸ Several factors are involved in the virulence of this yeast such as adherence, dimorphism, phenotypic switching, synergism with bacteria, antigenic variation, immune modulation of the host defense mechanism,⁹⁻¹² adhesins and secretion of proteases.^{13, 14, 15, 16}

Some authors have reported that *C. albicans* can co-aggregate with bacteria existing in the oral cavity, which favors their adhesion to oral mucosa and tooth structures.^{17,18,19} Nikawa *et al.*²⁰ analyzed the coadherence of *C. albicans* with oral bacteria and observed its predominant presence during co-adhesion with *S. mutans* in a medium supplemented with sucrose. The authors considered that this co-aggregation could play an important role in the ecology of oral biofilms. In another study, Cannon *et al.*⁹ reported that *C. albicans* adhered to saliva-coated hydroxylapatite (HAP) with a relatively high affinity. However, little attention has been given to the adherence or colonization of *C. albicans* on enamel surfaces.⁵

HIV-infected children have a greater prevalence of caries compared to non-infected children^{21,22} and the presence of cavitated carious lesions can function as a retentive site for *Candida*.²² The presence of *C. albicans* in carious lesions has been reported in the literature.² Further, Jacob *et al.*²³, demonstrated that the presence of this yeast in dentinal tubules of HIV-infected patients was higher than in non-infected patients. Some *in vitro* studies have also pointed out the high acidogenic potential of

C. albicans and have suggested that this acidogenic potential is associated with demineralization of tooth surfaces.^{12, 24, 25, 26, 27}

Due to the importance of caries control in HIV infected children, knowledge of different mechanisms that enhance caries development in this population is urgently indeed. So the purpose of the present study was to analyze, *in vitro*, the potential of *Candida albicans*, isolated from different oral cavity sites of a HIV-infected child, to demineralize permanent enamel.

MATERIALS and METHODS

Selection of isolates of *Candida albicans*

Two isolates of *Candida albicans* stored at the Microbiology Institute of the Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ) were selected. One was from the oral mucosa (M) and one from a dentin carious lesion (DCL), both from the same HIV - infected pediatric patient.

In brief, the collection of these isolates was made as follow: the clinical specimens collected from the oral mucosa and dentin carious lesion were carried out by a trained professional using a sterile swab and a n°5 sterile dentinal curette (Duflex[®]), respectively and then deposited in 1 mL of saline solution (0.85% NaCl). In order to identify the specimen, 100 µL of each solution was seeded in plates with a chromogenic agar (CHROMagar *Candida*[®]) incubated at 37°C for 48-72 hours, which allows a presumptive identification of *Candida* spp. through the color of each colony formed.²⁸ Colonies with different colors were definitively identified by using biochemical tests for sugar assimilation and fermentation according to the API 20C system (Biomerieux, Marcy L'Etoile, France). Isolates were then stored in refrigerated

Sabouraud's dextrose. This study was approved by the Ethic Committee and informed consent was obtained from the legal guardians of the child.

Biofilm formation by *C. albicans*

A total of 10 healthy permanent molars, donated from patients from The Surgery Clinic of a Public School of Dentistry, Rio de Janeiro, Brazil, were selected. A careful, reflected-light microscopic examination was performed to exclude any teeth that were not intact or did not have a homogeneous enamel surface. The crowns were separated from the roots and then cut into 5 x 5 x 2 mm blocks with a *Carborundum* disc, making a total of 36 enamel blocks. The surface of enamel was cleaned using pumice, but it was not polished or flattened.²⁹ Red nail varnish (two coats, 24hs drying) was then applied on the enamel specimens, except for a small window (6.06 mm²) which would be exposed to *Candida albicans* biofilm.

The enamel blocks, previously prepared and sterilized (autoclaved at 121°C for 15 min)³⁰, were then fixed in *Petri* plates with yeast carbon base (YCB) agar medium (Difco Detroit, MI, USA) supplemented with 1% of bovine serum albumin (BSA) (Difco). The enamel surface was face up and the other surfaces were set in the agar medium. Cellular suspensions with 10⁵ yeast/mL were inoculated into the *Petri* plates and biofilm formed over the specimens after incubation at 37°C, without shaking.³¹ The enamel blocks were divided in three groups: group 1 with biofilm formation by *C. albicans* isolated from the oral mucosa; group 2 with biofilm formation by *C. albicans* isolated from the dentin carious lesion; and group 3 with no biofilm formation (medium control). Three enamel blocks of each group were removed on the 3rd, 5th, 8th and 10th days after biofilm formation. After removal, they were cleaned

with a soft toothbrush and water and then sterilized (autoclaved at 121°C for 15 min)³⁰ and stored in a closed environment with 100% humidity for posterior analysis.

Cross-sectional Microhardness (CSMH) analysis

The enamel blocks were longitudinally sectioned, embedded in acrylic resin and the cut enamel surfaces were exposed and polished. The CSMH were measured with a Knoop diamond indenter under a 50-gram load for 15s.^{32,33} Five equidistant indentations (30, 60, 90, 120, 150 µm) from the outer enamel surface were made on the enamel exposed to biofilm formation and five others on the non-exposed enamel (tooth control). The average of 5 indentations was used for CSMH determination.

Statistical Analyses

Data was submitted to a descriptive analysis for comparisons of the CSMH between the three groups and to statistical analysis by ANOVA (5%) for comparisons between the different days and Mann-Whitney (5%) for comparisons between the enamel exposed to biofilm with the non-exposed.

RESULTS

The data from enamel microhardness exposed to biofilm formation by *C. albicans* in permanent blocks are shown in Table 1. A significant decrease of microhardness against time was observed. In group 1 and 2 the microhardness on the 10th day was significant lower in the two groups when compared to the first measurements on the third day.

Comparing the three groups, in group 1 (*Candida* isolated from M) there was a significant decrease in microhardness of the exposed enamel only after the 5th day of biofilm formation in comparison to the non-exposed enamel (tooth control). In group 2

where the enamel blocks were exposed to *Candida* isolated from DCL, this difference occurred on the third day. In group 3, no significant values were found ($p>0.05$).

Also, the mean perceptual reduction in microhardness was calculated. The perceptual reduction in microhardness during the experiment was lower for the control medium system (5.3%) and was similar for the groups with biofilm formation by *C. albicans* from M (43.90%) and DCL (53.19%) (Graph 1).

DISCUSSION

Dental caries continue to present a high prevalence in HIV-infected children, despite an emphasis on prevention for this population.^{21,22} The association between oral carriage of *Candida* and dental caries in these children has been demonstrated in recent studies. Cerqueira *et al.*²² observed a significant correlation between the number of carious teeth and *Candida* CFU values in 62 HIV infected children. This indicates, according to the authors, that caries lesions could be considered a risk for *Candida* colonization and oral candidiasis development.

Although little information in the literature is available concerning the process of enamel demineralization by *Candida albicans*, *in vitro* studies have suggested that this yeast has a high acidogenic potential^{24,25,26,27} and capacity for dissolution of hydroxylapatite (HAP).^{9,12} So our study represents one of the relatively few studies analyzing *in vitro* the demineralization potential of this yeast.

Nikawa *et al.*¹² observed that *C. albicans* are able to dissolve hydroxylapatite (HAP) and compared it to *S. mutans*. In our present study, results show decreases in microhardness of enamel in permanent teeth (Table 1) after exposition of *C. albicans* biofilm. Collectively, these findings indicate that yeast may cause demineralization

and it could be a co-helper in cariogenic development. The studies showing that the adherence of *C. albicans* was particularly high to HAP¹² were consistent with the observations of Sen *et al.*⁵, who demonstrated that *C. albicans* easily colonized enamel, dentine and cement surfaces. Therefore, to clarify which mechanisms are involved in this adherence becomes very important, although the interaction yeast-HAP is expected to be complex.¹² According to Nikawa *et al.*³⁴, proteic components of the yeast cell wall interact electrostatically with phosphate and calcium ions for effective adherence with HAP which contribute to the *C. albicans* adherence to solid surfaces.⁹

Our results concerning demineralization showed statistically differences ($p < 0.05$) in the mineral loss process of the enamel surface in relation to time. By the 3rd day, demineralization of exposed enamel was already significant, compared to non-exposed enamel when isolates from dentine were used. When the isolate was from oral mucosa, significant demineralization was observed only after the 5th day. This might suggest that the isolate virulence depends on the environmental conditions such as local acidic conditions, physical protection and interaction with other microorganisms.^{35,36} Corroborating, Tavanti *et al.*⁴¹, observed differences in the proteases expression pattern in oral isolates from the same specie but with different karyotypes. Also, Jin *et al.*³⁶ related a phenotypes variance in *C. albicans* biofilm when compared with planktonic yeasts. These phenotypes demonstrated differing profiles for carbohydrate assimilation, adhesion, biofilm formation, filamentation and growth rate, which might affect multiple biological attributes. We can speculate that these findings could explain our results, since the isolates were from the same patient although from different sites.

In addition, *Candida* may show interaction with other microorganisms.^{37,38,19,39,20} Particularly, co-aggregation reactions with bacteria can play a large role in the colonization of oral mucosa and hard tissues.^{18,19} Some studies had already identified the cells that were involved in this co-aggregation.^{38,40,18} Once yeast cells become attached to bacteria and/or oral surfaces, their growth may be enhanced by the metabolic products of oral bacteria. Bacterial bridging may be important in the colonization of *C. albicans*, as it persists even in a normal oral flora.

Finally, we suggested that the control of these fungi in the oral cavity of HIV infected children may be very important for prevent nor only the oral candidiasis, but also the caries disease.

In conclusion, according to our results *C. albicans* might cause *in vitro* demineralization of permanent enamel surfaces, with differences in relation to the time and site of oral isolate collection. These results also suggest that this yeast could present some cariogenic potential.

Acknowledgments: This study was supported by CNPq, FAPERJ

REFERENCES

- 1 Arendorf TM, Walker DM. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. *Archs Oral Biol* 1980; **25**:1-10.
- 2 Hossain H, Ansari F, Schulz-Weidner N. Clonal identity of *Candida albicans* in the oral cavity and the gastrointestinal tract of pre-school children. *Oral Microbiol Immun* 2003; **18**: 302-308.
- 3 Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol* 2003; **67**: 400-428.
- 4 Chigurupati R, Raghavan SS, Studen-Pavlovich DA. Pediatric HIV infection and its oral manifestations: a review. *Pediat Dent* 1996; **18**: 106-113.

- 5 Sen BH, Safavi KE, Spangberg LSW. Colonization of *Candida albicans* on cleaned human dental hard tissues. *Archs Oral Biol* 1997; **42**: 513-520.
- 6 Pongsiriwet S, Iamaroon A, Sriburee P *et al.* Oral colonization of *Candida* species in perinatally HIV-infected children in Northern Thailand. *J Oral Science* 2004; **46**:101-105.
- 7 Portela MB, Souza IPR, Costa EMMB *et al.* Differential recovery of *Candida* species from subgingival sites in Human Immunodeficiency Virus-Positive and healthy children from Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 5925-27.
- 8 Chattopadhyay A, Caplan DJ, Slade GD *et al.* Risk indicators for oral candidiasis and oral hairy leukoplakia in HIV-infected adults. *Community Dent Oral Epidemiol* 2005; **33**: 35-44.
- 9 Cannon RD, Nand AK, Jenkinson HF. Adherence of *Candida albicans* to human salivary components adsorbed to hydroxylapatite. *Microbiology* 1995; **141**: 213–9.
- 10 Sweet SP. Selection and pathogenicity of *Candida albicans* in HIV infection. *Oral Dis* 1997; **3**: S88-S95.
- 11 Costa EMMB, Santos ALS, Cardoso AS *et al* Heterogeneity of metallo and serine extracellular proteases in oral clinical isolates of *Candida albicans* in HIV-positive and healthy children from Rio de Janeiro. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003; **38**: 173-180.
- 12 Nikawa H, Yamashiro H, Makihira S *et al.* *In vitro* cariogenic potential of *Candida albicans*. *Mycoses* 2003; **46**: 471-478.
- 13 Sánchez-Martínez C, Péres-Martin J. Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis* – similar inputs, different outputs. *Curr Opin Microbiol* 2001; **4**: 214-21.
- 14 Rodier MH, Moudni B, Kauffmann-Lacroix C *et al.* A *Candida albicans* metallopeptidase degrades constitutive proteins of extracellular matrix. *FEMS Microbiol* 1999; **177**: 205-210.
- 15 Naglik J, Albrecht A, Bader O, Hube B. *Candida albicans* proteases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol* 2004; **6**: 915-926.
- 16 Manfredi M, Mccullough MJ, Al-Karaawi ZM *et al.* *In vitro* evaluation of virulence attributes of *Candida* spp, isolada de pacientes afetados pela diabete melitos. *Oral Microbiol Immunol* 2006; **21**: 183-189.
- 17 Bagg J, Silverwood RW. Coagglutination reactions between *Candida albicans* and oral bacteria. *J Med Microbiol* 1986; **22**: 165-169.
- 18 Jenkinson HF, Lala HC, Shepherd MG. Coaggregation of *Streptococcus sanguis* and other streptococci with *Candida albicans*. *Infect Immun* 1990; **58**: 1429-1436.

- 19 Grimaudo NJ, Nesbitt WE, Clark WB. Coaggregation of *Candida albicans* with oral *Actinomyces* species. *Oral Microbiol Immunol* 1996; **11**: 59-61.
- 20 Nikawa H, Egusa H, Makihira S, Yamashiro H, Fukushima H *et al.* Alteration of the coadherence of *Candida albicans* with oral bacteria by dietary sugars. *Oral Microbiol Immunol* 2001; **16**: 279–283.
- 21 Castro GF, Souza IPR, Lopes S, Stashenko P, Teles RP. Salivary IgA to cariogenic bacteria in HIV-positive children and its correlation with caries prevalence and levels of cariogenic microorganisms. *Oral Microbiol Immunol* 2004; **19**: 281-288.
- 22 Cerqueira DF, Portela MB, Pomarico L *et al.* Dentinal carious lesions: A predisposing factor for the oral prevalence of *Candida* ssp. in HIV-infected children. *ASDC J Dent Child* 2007; **74**: 98-103.
- 23 Jacob LS, Flaitz CM, Nichols M, Hicks JM. Role of dentinal carious lesions in the pathogenesis of oral candidiasis in HIV infection. *JADA* 1998; **129**: 187-194.
- 24 Samaranayake LP, Geddes DAM, Weetman DA, Mac-Farlane TW. Growth and acid production of *Candida albicans* in carbohydrate supplemented media. *Microbios* 1983; **37**: 105–15.
- 25 Samaranayake LP, Hughes A, Weetman DA, Macfarlane TW. Growth and acid production of *Candida* species in human saliva supplemented with glucose. *J Oral Pathol* 1986; **15**: 251–4.
- 26 Nikawa H, Hayashi S, Nikawa Y, Hamada T, Samaranayake LP. Interactions between denture lining materials, protein pellicles and *Candida albicans*. *Arch Oral Biol* 1993; **38**: 631–4.
- 27 Nikawa H, Yamamoto T, Hayashi S, Nikawa Y, Hamada T. Growth and/or acid production of *Candida albicans* on soft lining materials *in vitro*. *J Oral Rehabil* 1994; **21**: 585–94.
- 28 Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1994; **32**: 1923-29.
- 29 Cury JA, Vasques RA, Tabchoury CPM, Tenuta LMA, Cury AA. Effect of Frequency of Sucrose Exposure on Dental Biofilm Composition and Enamel Demineralization in the Presence of Fluoride. *Caries Research* 2007; **41**: 9-15.
- 30 Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM. Efficacy of sterilization methods and their effect on enamel demineralization. *Caries Res* 1998; **32**: 441-6.
- 31 Machado FC. Avaliação da Clorexidina para controle de gengivite e *Candida* spp. em crianças infectadas pelo HIV. Orientador: Ivete Pomarico Ribeiro de Souza, Gloria Fernanda de Araujo Castro. Rio de Janeiro: UFRJ, 2007. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria)

- 32 Craig RG, Peyton FA. The microhardness of enamel and dentine. *J. dent Res* 1958; **37**: 661-668.
- 33 Featherstone JD, Ten Cate JM, Shariati M, Arends J. Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. *Caries Res* 1983; **17**: 385–391.
- 34 Nikawa H, Hamada T, Yamashiro H, Murata H, Subiwahjudi A. The effect of saliva or serum on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* colonization of hydroxylapatite beads. *J Dent* 1998; **26**: 31–37.
- 35 Filoche, SK; Soma KJ; Sissons, CH. Caries related plaque microcosm biofilms development in microplates. *Oral Microbiol Immunol* 2003; **22**:73-79,
- 36 Jin Y, Samaranayake YH, Yip HK *et al.* Characterization of switch phenotypes in *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia* 2005; **160**:191- 200.
- 37 Ann R, Holmes, Pramod K, Gopal, Howard F, Jenkinson. Adherence of *Candida albicans* to a Cell Surface Polysaccharide Receptor on *Streptococcus gordonii* *Infection and Immunity* 1995; **63**: 1827–34.
- 38 Holmes AR, Cannon RD, Jenkinson HF. Interactions of *Candida albicans* with bacteria and salivary molecules in oral biofilms. *J ind Microbial* 1995; **15**: 208-213.
- 39 Cannon RD, Sullivan O, Jenkinson HF. Adhesion of *Candida albicans* to oral *streptococci* is promoted by selective adsorption of salivary protein to the *streptococcal* cell surface. *Microbiology* 2000; **146**: 41-48.
- 40 Holmes A, Roderick MCN, Howard F, Jenkinson. *Candida albicans* Binding to the oral bacterium *Streptococcus gordonii* Involves Multiple Adhesin-Receptor Interactions. *Infection Immunity* 1996; **64**: 4680–85.
- 41 Tavanti A, Pardini G, Campa D, Davini P, Lupetti A, Senesi S. Differential expression of secretory aspartyl proteinase genes (SAP1-10) in oral *Candida albicans* isolates with distinct karyotypes. *J Clin Microbiol* 2004; **42**:4726-34.

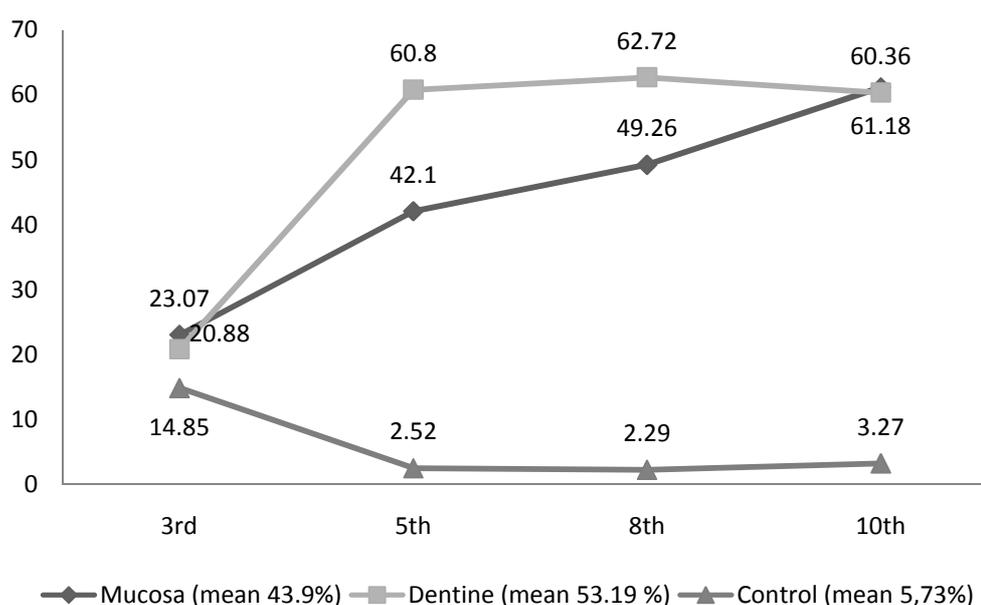
Table 1: Cross-sectional Microhardness (CSMH) values in permanent teeth enamel

Group	Day	Mean CSMH in enamel surface exposed to biofilm	Standard deviation (\pm SD)	Mean CSMH in enamel surface non-exposed to biofilm (Tooth control)	Standard deviation (\pm SD)	P-values Mann-Whitney
1 (n=12)	3 rd	249.48 ^a	\pm 5.70	324.26	\pm 33.63	N/S
	5 th	170.30^a	\pm 2.03	294.08	\pm 21.52	<0.05
	8 th	137.60^a	\pm 19.57	271.14	\pm 7.01	<0.05
	10 th	103.20^a	\pm 0.75	265.80	\pm 10.26	<0.05
2 (n=12)	3 rd	246.45^b	\pm 1.65	311.46	\pm 18.75	<0.05
	5 th	112.03^b	\pm 1.85	285.72	\pm 2.88	<0.05
	8 th	100.22^b	\pm 0.22	268.79	\pm 2.30	<0.05
	10 th	94.68^b	\pm 2.60	238.84	\pm 36.76	<0.05
3 (medium control) (n=12)	3 rd	255.91	\pm 11.52	300.52	\pm 5.03	NS
	5 th	270.65	\pm 0.04	277.62	\pm 12.30	NS
	8 th	259.96	\pm 22.14	263.34	\pm 4.63	NS
	10 th	277.90	\pm 13.83	287.28	\pm 8.88	NS

Note 1: Group 1: Biofilm formation by *C. albicans* from oral mucosa; Group 2: Biofilm formation by *C. albicans* from dentinal carious lesions; Group 3: no biofilm (medium control).

Note 2: a, b: statistical significance (ANOVA, $p < 0.05$)

Note 3: N/S: no statically significance (Mann-Whitney, $p > 0,05$)

Graph 1: Perceptual microhardness reduction (non-cumulative) in permanent blocks on the different groups.

4.2 Artigo 2

***Candida* spp. isoladas do biofilme supragengival de crianças infectadas pelo HIV, sua associação com a doença cárie e seu potencial (*in vitro*) de desmineralização**

Senda Charone*

Maristela Barbosa Portela*

Ivete Pomarico Ribeiro de Souza***

Renata Simão****

Rosangela Maria Soares*****

Gloria Fernanda Castro*****

*Mestranda em Odontopediatria, Departamento de Odontopediatria e Ortodontia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ); **Pós-doutoranda, Departamento de Odontopediatria e Ortodontia, UFRJ; ***Professor Titular Departamento de Ortodontia e Odontopediatria, UFRJ; **** Professor Adjunto do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, COPPE/UFRJ; *****Professor Associado do Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes (IMPPG), UFRJ; ***** Professora Adjunto do Departamento de Ortodontia e Odontopediatria, UFRJ.

RESUMO

O objetivo foi identificar a presença de *Candida* spp. no biofilme dental supragengival de 50 crianças infectadas pelo HIV e sua relação com a presença da doença cárie, imunossupressão e uso de HAART. Também analisou *in vitro* o potencial de desmineralização por *Candida* spp. no esmalte decíduo. Para a coleta do biofilme, utilizou-se curetas dentinárias nº20 estéreis friccionada sobre a superfície dentária vestibular. Realizou-se exame para determinação dos índices de cárie, presença de manchas brancas ativas (MBA) e lesões ativas cavitadas em esmalte (CAE). Cento e quarenta (140) blocos de esmalte decíduo foram fixados em placas de 24-poços contendo meio de cultura YCB agar suplementado com 1% de BSA totalizando 10 placas. Cada placa continha 14 blocos, com a superfície do esmalte voltada para cima e o restante imerso completamente no meio de cultura. Formaram-se 6 Grupos: G1: esmalte exposto a biofilme de *C. albicans* (5 placas); G2: exposto a biofilme de *C. albicans* e *C. tropicalis* (1 placa); G3: exposto a biofilme de *C. albicans* e *C. parapsilosis* (1 placa); G4: exposto a biofilme de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* (1 placa); G5: exposto a biofilme de *C. albicans* (ATCC 24433) (1 placa); G6: ausência de biofilme (controle do meio) (1 placa). Suspensões celulares 10^5 de leveduras/mL cultivadas no mesmo meio de cultura (caldo) foram inoculadas. De cada placa, dois (2) blocos foram retirados no 1º, 3º, 5º, 8º, 10º, 12º e 15º dia após formação de biofilme. Realizou-se microdureza transversal (MDT) do esmalte de todos os grupos através de um indentador Knoop com carga de 50 gramas por 15 segundos. Imagens de G1 e G6 foram observadas através de Microscopia de Luz Polarizada. Todas as crianças apresentaram crescimento positivo (n=50, 100%) para *Candida* spp. e a *C. albicans* foi a espécie mais prevalente (n=50, 100%). Observou-se que quanto maior a quantidade de biofilme sobre as superfícies dentais, maior a quantidade de *Candida* spp. ($p=0,048$). Não foram observadas diferenças no número de ufc/mL de *Candida* spp. e *C. albicans* nas crianças com ou sem cárie ($p>0,05$). Não foi observado relação entre imunossupressão e uso de HAART com a presença da levedura no biofilme. Uma diminuição gradativa significativa ($p<0,05$) foi observada nos valores de MDT do 1º ao 15º dia nas áreas de esmalte expostas ao biofilme, nos G1 ao G5; comparando-se as áreas expostas e protegidas em cada um dos dias no G1, à partir do 5º dia houve uma diferença significativa na MDT dos mesmos ($p<0,05$). As imagens de microscopia de luz polarizada dos fragmentos do G1 revelou lesões subsuperficiais indicando aumento da porosidade em relação a superfície aumentando no decorrer do experimento. Conclui-se que *Candida* spp. está presente no biofilme supragengival de crianças infectadas pelo HIV e estas espécies podem causar perda mineral do esmalte decíduo.

Palavras-chave: *Candida* spp., cárie, desmineralização, biofilme dental, criança, infecção pelo HIV.

INTRODUÇÃO

As crianças infectadas pelo HIV parecem apresentar uma maior prevalência da doença cárie quando comparadas às não-infectadas (SOUZA *et al.*, 1996a; CASTRO *et al.*, 2004; HODGSON *et al.*, 2006b; CERQUEIRA *et al.*, 2007). As hipóteses mais prováveis para este achado, segundo a literatura, são: ingestão de uma dieta hipercalórica, alto teor de sacarose presente nos medicamentos ingeridos (GREENSPAN & GREENSPAN, 1994; POMARICO *et al.*, 2008), imunossupressão com queda de IgA secretória devido a progressão da infecção pelo HIV (CASTRO *et al.*, 2004), higiene bucal deficiente (ELDRIDGE & GALLAGHER, 2000; FREZZINI *et al.*, 2005) e outros. Ainda, estudo realizado por RIBEIRO *et al.*, (2002), destacou que a qualidade e quantidade de biofilme dental também representam um fator importante na atividade cariogênica dessas crianças, pois de acordo com seus resultados, quanto mais espesso e maduro o biofilme sobre as superfícies dentais, maior o número de lesões cariosas ativas.

A prevalência de *Candida* spp. na cavidade bucal de crianças infectadas pelo HIV, também é bem elevada (HICKS *et al.*, 1998; CASTRO *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2001; BOSCO *et al.*, 2003). De todas as espécies, a *Candida albicans* é o agente etiológico mais freqüentemente encontrado em lesões de candidíase bucal (NICOLATOU-GALITIS *et al.*, 2004; PONGSIRIWET *et al.*, 2004; PORTELA *et al.*, 2004; RUIZ *et al.*, 2006; CERQUEIRA *et al.*, 2007), principal lesão associada à infecção pelo HIV em crianças. Entretanto, estudos evidenciam também a presença de outras espécies com características patogênicas causadoras de infecções fúngicas como a *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. stellatoidea* (SÁNCHEZ-VARGAS, *et al.*, 2002; CHENG *et al.*, 2005;

RICHARDSON, 2005) e *C. dubliniensis* (SULLIVAN *et al.*, 1995; PORTELA *et al.*, 2004; FREZZINI *et al.*, 2005).

A associação entre a presença de leveduras e a cárie dentária tem sido relatada na literatura por vários autores (JACOB *et al.*, 1998; SZIEGOLEIT *et al.*, 1999; STARR *et al.*, 2002; AKDENIZ *et al.*, 2002; REGO *et al.*, 2003). Estudos demonstram que a *C. albicans* é mais prevalente em biofilme dental e saliva de crianças cárie-ativas quando comparadas com crianças livres de cárie (RADFORD *et al.*, 2000; MOALIC *et al.*, 2001; HOSSAIN *et al.*, 2003). CERQUEIRA *et al.*, (2007) em um estudo comparativo entre crianças infectadas pelo HIV e crianças saudáveis, observaram uma maior prevalência de *Candida* spp. no grupo das crianças infectadas. Além disso, observaram relação entre elevada prevalência de espécies de *Candida* e uma maior quantidade de lesões cariosas cavitadas em dentina.

Um dos fatores a serem considerados na cariogenicidade do biofilme dental é a concentração de polissacarídeos insolúveis na matriz, responsáveis pelo aumento de sua porosidade, permitindo a penetração de substratos acidogênicos para as camadas mais internas do biofilme e conseqüente produção de ácidos próximos à estrutura dentária (DIBDIN & SHELLIS, 1988; TAKARASH *et al.*, 2008). Um estudo realizado por NIKAWA *et al.* (1998) sugere a possibilidade do aumento da cariogenicidade do biofilme dental colonizado por *C. albicans*. Evidências também sugerem que esta levedura produz ácido láctico através da fermentação dos carboidratos e ainda de que este ácido degradaria a estrutura da hidroxiapatita dental. Além disso, as leveduras podem produzir enzimas com atividade colagenolítica (aspártico – proteases) capazes de hidrolisar o colágeno dental (NISHIMURA *et al.*, 2002).

Considerando a importância de investigar os possíveis fatores que possam estar envolvidos no processo de instalação e desenvolvimento da doença cárie nesses pacientes, tornam-se relevantes estudos dessa natureza. Portanto, o objetivo do presente estudo foi analisar a colonização de *Candida* spp. no biofilme supragengival de crianças infectadas pelo HIV e avaliar sua relação com a presença da doença cárie, imunossupressão e uso de HAART. Também foi avaliado o potencial de desmineralização, *in vitro*, destas leveduras.

MATERIAL e MÉTODOS

O universo amostral foi compreendido pelos pacientes pediátricos com diagnóstico definitivo para infecção pelo HIV conforme critério adotado pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, 1994), provenientes de uma coorte de crianças infectadas pelo HIV, que fazem parte do Serviço de AIDS Pediátrica do IPPMG/UFRJ e, acompanhados pelo Projeto SIDA/AIDS em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (FO/UFRJ). A seleção da amostra adotou procedimentos por conveniência a partir do recrutamento de pacientes infantis no período de oito meses. Após obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, devidamente assinado pelo responsável legal da criança e anuência da mesma, a amostra final foi constituída por cinquenta (50) crianças de ambos os sexos, na faixa etária de 3 a 12 anos de idade.

Todas as crianças deveriam apresentar biofilme supragengival espesso (escore 3, 4 e 5) nas superfícies dentais de acordo com o índice proposto por RIBEIRO *et al.* (2002) (Quadro 1). Além disso, estas crianças não poderiam estar em uso de terapia antifúngica há pelo menos três meses prévios à coleta, ou em uso de medicamentos antimicrobianos tópicos orofaríngeos (ODDEN *et al.*, 1995).

Dados sobre a história médica (classificação clínica e imunológica da doença, diagnóstico de AIDS, tipo de transmissão, uso de medicamentos antiretrovirais) e exames laboratoriais (CD4%, CD8%, relação CD4/CD8, carga viral) mais recentes a data da coleta e exame bucal, com intervalo máximo de 03 meses, foram obtidos através da pesquisa aos prontuários médicos dos respectivos pacientes.

Coleta do biofilme supragengival

O exame do biofilme dental supragengival foi realizado por meio de inspeção visual da cavidade bucal do paciente, por um examinador previamente calibrado. O biofilme foi classificado como fino quando, somente após a secagem da superfície dentária com uma gaze, sem fazer movimentos esfregatórios, ele pudesse ser visualizado. O biofilme foi considerado como espesso quando mesmo sem secar a superfície, ele pudesse ser clinicamente visto. Para classificar a resistência à remoção do biofilme, um único movimento esfregatório lateral com a gaze (de distal para mesial, ou vice-versa) era empregado, e observava-se a sua remoção (se com facilidade ou não). Desta forma, o biofilme foi registrado como 3, 4 ou 5 (scores do Índice, Quadro 1) quando a espessa quantidade de acúmulo ofereceu resistência para ser completamente removida pela gaze.

Para a coleta do biofilme, utilizou-se curetas dentinárias nº20 (Duflex®) estéreis, friccionada sobre a superfície dentária vestibular de mais fácil acesso e que melhor permitisse isolamento relativo da saliva. A cureta era apoiada na região cervical do dente, seguindo de mesial para distal, até que a mesma permanecesse completamente preenchida. Em seguida, o material coletado foi transferido para tubos *ependorffs* estéreis, contendo 1 mL de solução salina (NaCl a 0,85%) sendo mantido sob refrigeração, e transportado para subseqüentes análises laboratoriais

em um prazo máximo de 2 horas. Após a coleta, foi realizada escovação supervisionada, exame extra e intrabucal para verificação da presença de manifestações bucais associadas à infecção pelo HIV e determinação dos índices de cárie (OMS, 1987). A identificação da presença de manchas brancas ativas (MBA) e lesões ativas cavitadas em esmalte (CAE) também foram registradas e analisadas separadamente. Os critérios de diagnóstico para estas lesões foram aqueles estabelecidos por BJORN DAL *et al.* (1997) e CARVALHO *et al.* (1992).

Análise microbiológica

Para a quantificação e identificação presuntiva das espécies de *Candida*, os tubos contendo os espécimes clínicos foram homogeneizados em um agitador (vórtex) durante 30 segundos e em seguida as suspensões foram diluídas na proporção de 1:1 em NaCl (0,85%) estéril. A partir desta diluição, 100 µL de cada suspensão foram inoculadas e semeadas em placas *Petri* contendo meio de cultura CHROMagar *Candida*[®], sendo incubadas em estufa à 37°C por 48 e 72 horas possibilitando a identificação presuntiva das espécies de *Candida* através da coloração das colônias reveladas (ODDS & BERNAERTS, 1994). O crescimento foi classificado de acordo com HOSSAIN *et al.* (2003) a partir da contagem das unidades formadoras de colônias (ufc/mL) como: 0 = ausente; 1 = muito escasso (<10 colônias); 2 = escasso (10-10² colônias); 3 = moderado (10²-10³ colônias); 4 = numeroso (> 10³ colônias). Para identificação definitiva, as colônias com colorações diferentes de cada paciente foram analisadas através de testes bioquímicos de fermentação e assimilação de açúcares através do sistema API 20C (Biomérieux, Marcy L'Etoile, France) e as reações lidas após 48 e 72 horas à 37°C. Todas as

espécies de *Candida* isoladas e identificadas foram estocadas sendo mantidas em tubos de rosca contendo 5 mL de meio agar Sabouraud dextrose estéril à 4°C.

Formação de biofilme *In vitro* por espécies de *Candida*

Foram selecionados sessenta (60) molares decíduos exfoliados, hígidos, sem quaisquer alterações visíveis ao Microscópio Esterioscópico (40x, Astro Optics Division, Montpelier, USA) em sua face vestibular ou lingual. Posteriormente, realizou-se o corte dos mesmos por meio de disco diamantado dupla-face em peça reta em baixa rotação, originando um total de cento e quarenta (140) blocos de esmalte decíduo (5 x 5 x 2 mm), obtidos do terço médio da superfície vestibular ou lingual. Os blocos de esmalte foram limpos com água e pedra pomes, porém, não foi realizado lixamento ou polimento das superfícies (CURY *et al.*, 2007). Em seguida, todas as superfícies foram protegidas com esmalte cosmético de cor vermelha (2 revestimentos, 24hrs de secagem), exceto uma área circular de 6,06 mm², confeccionada no centro da superfície exposta de cada bloco de esmalte.

Foram selecionados aleatoriamente cinco (5) isolados de *C. albicans* oriundas do biofilme dental de cinco (5) pacientes diferentes que apresentaram somente esta espécie; e isolados de *C. albicans* e não-*albicans* de pacientes que obtiveram simultaneamente os seguintes isolados: um (1) com *C. albicans* e *C. parapsilosis* simultaneamente; um (1) com *C. albicans* e *C. tropicalis*; um (1) com *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* e, um (1) isolado referência *C. albicans* (ATCC 24433).

Os blocos dentais sofreram então esterilização por calor úmido (autoclave, 15 minutos a 121°C) (AMAECCHI *et al.*, 1998) e após foram fixados em placas de 24-poços contendo meio de cultura YCB agar (Yeast Carbon Base, Difco, Bacto), suplementado com 1% de BSA (Bovine Serum Albumin). Um total de 10 placas de

24-poços contendo 14 blocos dentais cada, com a superfície do esmalte voltada para cima e o restante imerso completamente no meio de cultura, foram divididas em 6 grupos como se segue: Grupo 1: esmalte exposto a biofilme formado por *C. albicans* (5 placas); Grupo 2: exposto a biofilme misto formado por *C. albicans* e *C. tropicalis* (1 placa); Grupo 3: exposto a biofilme misto formado por *C. albicans* e *C. parapsilosis* (1 placa); Grupo 4: exposto a biofilme misto formado por *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* (1 placa); Grupo 5: exposto a biofilme formado por *C. albicans* (ATCC 24433) (1 placa); Grupo 6: ausência de biofilme de *Candida* (controle do meio) (1 placa). Suspensões celulares padronizadas com 10^5 de leveduras/mL cultivadas em meio de cultura YCB caldo suplementado com 1% de BSA, sob agitação por 48 horas à 37°C, foram inoculadas em cada poço da placa, exceto para placa controle que continha os blocos dentais imersos apenas em 1 mL de meio de cultura YCB + 1% de BSA. A formação de biofilme, realizada de acordo com a metodologia descrita por MACHADO (2007) modificada, ocorreu após a incubação das placas à 37°C. De cada placa, dois (2) blocos dentais foram retirados no 1º, 3º, 5º, 8º, 10º, 12º e 15º dia após formação de biofilme. Logo após a retirada, estes foram inseridos em tubos Falcon contendo 5 mL de NaCl (0,85%) e submetidos ao vórtex por um minuto sendo então verificada a viabilidade celular das células do biofilme através do teste de exclusão do corante azul de Trypan (PATTERSON, 1979). Em seguida, todos os blocos foram novamente esterilizados (autoclave), limpos com uma escova macia utilizando-se água e pedra pomes e, armazenados em um pote com algodão embebido em NaCl (0,85%) para garantir a umidade até o momento das subseqüentes análises (MORAES, 1998).

Quantificação da concentração de Íons Cálcio (Ca^{+2})

Para determinação da concentração de íons cálcio (Ca^{+2}) liberado dos blocos de esmalte decíduo para a suspensão, durante os 15 dias do experimento, um Espectrofotômetro de Absorção Atômica (CONTRAA 300, ANALYTIK JENA; ar chama/óxido nitroso) foi utilizado. Para isto, 1 mL da suspensão foi removida no 1º, 3º, 5º, 8º, 10º, 12º e 15º dia, de cada poço, centrifugada (3000xg, 3 minutos, a 4°C), e o sobrenadante obtido permaneceu estocado em tubos *Falcon* contendo 250µL de Ácido Nítrico 65% (HNO_3) sob refrigeração até o momento da análise (TEN CATE *et al.*, 2008, modificado).

Análise de Microdureza Transversal (MDT)

A microdureza transversal (MDT) do esmalte decíduo foi mensurada através de um indentador Knoop com carga de 50 gramas por 15 segundos (CRAIG *et al.*, 1958; FEATHERSTONE *et al.*, 1983). Os blocos de esmalte foram longitudinalmente seccionados na sua região equatorial utilizando-se um disco diamantado dupla-face, acoplado a uma cortadeira elétrica (BUEHLER, ISOMET) originando dois fragmentos de esmalte. Apenas uma metade de cada um dos blocos de esmalte foi embutida em resina acrílica e a superfície de esmalte exposta foi lixada com lixas *mesh* na seqüência de 1000, 1200 e 2400 (3M, Sumaré, Brasil) por 10 minutos. Após, receberam polimento em uma *politriz* com disco de feltro (Arotec Ind. & Com. Ltda; São Paulo, Brasil) e abrasivos à base de alumina em suspensão (1 e 0,3µm; South Bay Technology Inc.; San Clemente, USA) produzindo assim uma superfície plana e lisa. Para verificação da eliminação de riscos nas superfícies do esmalte entre as trocas seqüenciais das lixas, todas as amostras foram avaliadas em intervalos regulares de tempo, ao microscópio óptico (40x, Astro Optics Division,

Montpelier, USA). Para a determinação dos valores de microdureza transversal do esmalte interno padronizou-se as indentações nas distâncias de 12.5, 25, 37.5, 50, 62.5, 75, 87.5, 100, 112.5, 125, 137.5, 150 μm da superfície externa do esmalte seguindo em direção à junção-amelo-dentinária (JAD). Todas as indentações previamente padronizadas foram realizadas tanto nas áreas de esmalte expostas à formação de biofilme pelas espécies de *Candida*, como nas áreas não-expostas ao biofilme (áreas protegidas).

Análise de Microscopia de Luz Polarizada

Para análise qualitativa do esmalte, selecionou-se 14 fragmentos de esmalte oriundos da outra metade dos blocos de esmalte do Grupo 1. Estes foram observados em um microscópio de luz polarizada, sob nicóis cruzados, com acessórios de quartzo e com as amostras imersas em água destilada sob aumento de 100x. Os fragmentos foram preparados manualmente com lixas d'água de granulação crescente 1000, 1200 e 2400 e polidas com pasta para polimento sobre feltro, até que fosse obtida uma secção longitudinal de 100 μm (CARLSTROM, 1964), conferidas posteriormente com o auxílio de um micrômetro digital.

Análise Estatística

A calibração do examinador para todos os exames foi realizada por um examinador mais experiente, que foi treinado pelo padrão ouro no caso do índice de biofilme. O índice Kappa geral inter-examinador foi de 0,74. Índice intra-examinador não foi realizado, pois, após a consulta os pacientes eram encaminhados para tratamento dentário e instrução de higiene, fazendo com que ao retorno sua condição clínica estivesse modificada.

Os dados foram inseridos em um banco de dados criado no Programa EPI INFO versão 6.0. Para as correlações foram utilizados teste estatísticos não-paramétricos considerando uma distribuição não normal dos dados e o nível de significância considerado foi de 5% ($p < 0,05$). Foi realizada análise de variância (ANOVA) para verificar a relação entre o crescimento de *Candida* (ufc/mL) e índice de biofilme, presença de MBA e CAE e o teste de Mann-Whitney para as correlações entre *Candida* spp (ufc/mL) e presença da doença cárie, imunossupressão e uso de HAART.

Para a determinação da MDT foi realizada a soma dos valores das indentações e realizada a média aritmética. Os resultados foram então comparados entre os grupos e também nos diferentes dias e para tal foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e Mann-Whitney. Análise descritiva foi realizada para comparações entre.

RESULTADOS

A média de idade da amostra ($n=50$) foi de 10,04 anos (d.p: 1,78), sendo 28 crianças (56%) do sexo masculino. De acordo com critério estabelecido pelo CDC (1994), grande parte das crianças ($n=21$; 42%) apresentava ausência de imunossupressão. O uso de medicamentos antiretrovirais foi observado em 27 (54%) crianças, sendo que destas a grande maioria ($n=21$) estava sob uso de HAART (uso de 3 drogas ou mais) (Tabela 1). Relações significantes (Mann-Whitney $p > 0,05$) entre imunossupressão e uso de HAART com a presença da levedura no biofilme dental não foram observadas

Quanto à presença de manifestações bucais observou-se que 22% (n=11) das crianças apresentavam algum tipo de lesão. As lesões encontradas foram: hipertrofia de parótidas (n=8) e candidíase bucal (n=3), sendo que estas crianças apresentavam simultaneamente os dois tipos de lesão.

Relação entre biofilme dental, cárie dentária e *Candida* spp.

A maioria das crianças (n=24, 48%) apresentava biofilme com escore 4, seguido por 19 (38%) crianças com escore 5 e somente 7 (14%) crianças com escore 3 (Quadro 1). Observou-se uma alta prevalência de crianças apresentando a doença cárie (n=41, 82%), sendo o número de crianças com superfícies dentais apresentando mancha branca ativa em esmalte (MBA) (n=40, 80%) e lesões cavitadas ativas em esmalte (CAE) (n=16, 32%) bem elevado.

Todas as crianças apresentaram crescimento positivo (n=50, 100%) para *Candida* spp. no biofilme supragengival. De todas as espécies isoladas e identificadas a mais prevalente foi a *C. albicans* (n=50, 100%), seguida por *C. parapsilosis* (n=8, 16%), *C. tropicalis* (n=3, 6%) e *C. glabrata* (n=1, 2%). Sete (7) crianças apresentaram culturas mistas com crescimento simultâneo para *C. albicans* e *C. parapsilosis*, 3 crianças apresentaram simultaneamente as espécies *C. albicans* e *C. tropicalis*, e 1 criança apresentou *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. O crescimento das leveduras foi classificado quantitativamente como ausente, muito escasso, escasso, moderado e numeroso, de acordo com o número de unidades formadoras de colônias (ufc/mL) (HOSSAIN *et al.*, 2003). Na Tabela 2 encontra-se a distribuição de pacientes quanto ao número de ufc/mL das espécies de *Candida* isoladas do biofilme supragengival. Observou-se que a maioria apresentou

crescimento classificado como numeroso para a espécie *C. albicans* (n=27) assim como para as outras espécies isoladas.

Na Tabela 3 observa-se que quanto maior quantidade de dentes com biofilme espesso, maior o número de unidades formadoras de colônias/mL (ufc/mL) de *Candida* spp (ANOVA p=0,048). Embora não estatisticamente significante, o mesmo foi observado para *C. albicans*. Quanto à cárie, não foram observadas diferenças no número de ufc/mL de *Candida* spp. e *C. albicans* nas crianças com ou sem cárie (Mann-Whitney, p>0,05) (Tabela 4). Considerando apenas as crianças com cárie (n=41), aquelas que apresentavam crescimento numeroso para as leveduras apresentavam maior número de cárie ativa em esmalte (cavitação e/ou mancha branca ativa) (Tabela 5), apesar da análise também não ter demonstrado relação estatisticamente significativa.

Avaliação da Microdureza Transversal

As médias e os respectivos desvios padrão dos valores de microdureza transversal (MDT) do esmalte decíduo para os diferentes dias e grupos estão expressos na Tabela 6.

Observou-se uma diminuição gradativa significativa (ANOVA p<0,05) dos valores de microdureza ao longo do período do experimento (do 1º ao 15º dia) nas áreas de esmalte expostas ao biofilme, dos Grupos 1 ao 5. Nas áreas de esmalte não-expostas (protegidas), essa variação não foi significativa dentre esses Grupos. No Grupo 6 (controle do meio) tanto na área de esmalte exposta ao meio quanto na área não-exposta ao meio (protegida), não foi observada diferença significativa nos valores de microdureza.

Também se comparou os valores de microdureza entre as áreas expostas e protegidas em cada um dos dias no Grupo 1. Observou-se que a partir do 5º dia houve uma diferença significativa nesses valores (Mann-Whitney $p < 0,05$). Nos outros grupos não foram aplicados testes estatísticos para esta avaliação devido ao reduzido tamanho da amostra (dois fragmentos para cada dia). No entanto, analisando-se descritivamente os resultados observa-se comportamento semelhante nos Grupos 2, 3 e 4. No Grupo 5, a diferença em relação a diminuição dos valores de microdureza pode ser observada somente a partir do 10º dia. Já no Grupo 6 os valores de microdureza foram similares em todos os dias (Tabela 6).

Quantificação da concentração de Íons Cálcio (Ca^{+2})

Os resultados obtidos através da dosagem da concentração de íons Ca^{+2} estão expressos na Figura 1.

Imagens Microscopia de Luz Polarizada

No que se refere à observação da perda mineral através das imagens de microscopia de luz polarizada, foi possível identificar nas amostras que as áreas de esmalte expostas ao biofilme apresentavam uma zona superficial com birefringência negativa e com lesões subsuperficiais com birefringência positiva indicando aumento da porosidade em relação à superfície. Esta porosidade foi crescente em direção a junção-amelo-dentinária, aumentando no decorrer dos dias de experimento. Na Figura 2, estão representadas nas imagens 2A, 2C, 2E e 2G as áreas de esmalte expostas ao biofilme de um isolado de *C. albicans* no 1º, 5º, 8º e 15º dia respectivamente. As imagens 2B, 2D, 2F e 2H representam os respectivos controles (áreas não-expostas ao biofilme).

DISCUSSÃO

A cárie dentária em crianças infectadas pelo HIV tem sido relatada como uma doença de maior prevalência quando comparada com crianças saudáveis (CASTRO *et al.*, 2004; HODGSON *et al.*, 2006a; CERQUEIRA *et al.*, 2007). Nossos resultados demonstraram que 82% das crianças infectadas examinadas apresentavam a doença, e muitos delas possuíam grande quantidade de lesões iniciais tais como manchas brancas ativas e lesões cavitadas em esmalte. A investigação de fatores que possam estar contribuindo para esta situação nesse grupo de pacientes é, portanto de extrema importância.

Estudos sobre o possível envolvimento de leveduras e cárie dentária vêm sendo realizadas (GRABRIS *et al.*, 1999; RADFORD *et al.*, 2000; MONDIN, 2003; HOSSAIN *et al.*, 2003; CARVALHO *et al.*, 2006; 2007). Alguns desses estudos demonstram que *Candida* spp são mais prevalentes em biofilme dental de crianças cárie-ativas do que em crianças livres de cárie (HODSON & CRAIG, 1972; ARENDORF & WOLKER, 1980; RADFORD *et al.*, 2000).

No presente estudo, 100% das crianças apresentaram crescimento positivo para *Candida* spp. no biofilme supragengival e de todas as espécies identificadas a mais prevalente foi a *C. albicans* (n=50, 100%), seguida por *C. parapsilosis* (n=8, 16%), *C. tropicalis* (n=3, 6%) e *C. glabrata* (n=1, 2%). Estes achados corroboram com estudos prévios (RUSSELL & LAY, 1973; MARCHANT *et al.*, 2001; MONDIN, 2003; HOSSAIN *et al.*, 2003; CARVALHO *et al.*, 2006), que constataram ser a *C. albicans* a espécie mais prevalente no biofilme dental. Ao avaliar a relação entre o índice de biofilme (RIBEIRO *et al.*, 2002) e a colonização das leveduras, foi observado que quanto maior a quantidade de dentes com biofilme espesso sobre as

superfícies dentais, maior a quantidade de *Candida* spp. A presença de biofilme abundante sobre essas superfícies poderia prolongar as condições de baixo pH no biofilme e favorecer a seleção de microrganismos com potencial acidogênico tal como a *C. albicans* (SAMARANAYAKE *et al.*, 1983; SAMARANAYAKE *et al.*, 1986; NIKAWA *et al.*, 1993; NIKAWA *et al.*, 1994; NIKAWA *et al.*, 2003). No entanto, a relação entre presença de *C. albicans* e quantidade de biofilme neste estudo não foi significativa ($p > 0,05$).

NIKAWA *et al.* (2003) em um estudo *in vitro* observou que a *C. albicans* possui a propriedade de dissolver hidroxiapatita. Os autores também observaram que esta espécie possui atividade colagenolítica, aderindo-se tanto ao colágeno intacto como ao colágeno desnaturado por diferentes mecanismos, o que poderia contribuir para a persistência da levedura na superfície da hidroxiapatita dissolvida (NISHIMURA *et al.*, 2002). O colágeno exposto e a alta capacidade de aderência a ele serviriam como um sítio de aderência e de colonização (MAKIHIRA *et al.*, 2001; MAKIHIRA *et al.*, 2002). O potencial acidogênico de isolados de *C. albicans* e *C. glabrata* foi investigado, *in vitro*, por SAMARANAYAKE *et al.*, (1986). Segundo os autores, as características de crescimento e produção de ácidos dos isolados foram potencializados na presença de meio contendo glicose e com isso, foram responsáveis pela redução do pH do meio. Embora sejam poucos, esses estudos demonstram alguma evidência do potencial cariogênico desta levedura. Isto poderia contribuir para uma possível participação no desenvolvimento do processo carioso em pacientes fortemente colonizados por esses fungos.

Quando observada em nosso estudo a relação entre presença da doença cárie, bem como presença de MBA e CAE, e colonização por *Candida* spp. no biofilme, nenhuma relação significativa pode ser encontrada. No entanto, analisando

descritivamente os resultados, pode-se observar que crianças que apresentavam crescimento classificado como numeroso para *Candida* possuíam uma quantidade maior tanto de mancha branca, quanto para cavitação ativa em esmalte.

A imunossupressão é um fator predisponente para a colonização por espécies de *Candida* em pacientes infectados pelo HIV (KEATING *et al.*, 1995; FLAITS *et al.*, 1999). Porém, a maioria das crianças deste estudo apresentava imunossupressão ausente ou moderada, e estava sob uso do HAART, o que provavelmente pode ter influenciado o fato de não ter havido nenhuma relação entre essas variáveis e o crescimento de *Candida* spp..

Quanto à análise de microdureza do esmalte decíduo exposto à formação de biofilme por *Candida* spp., nossos resultados demonstraram uma diminuição significativa dos valores durante todo o experimento. Também foi possível constatar que no grupo exposto ao biofilme de *C. albicans* (Grupo 1), a partir do 5º dia já ocorreu uma diferença entre os valores de MDT comparando-se as áreas exposta e não-exposta (controle do dente) ao biofilme. Isto parece coincidir com o fato de que as leveduras a partir do 5º dia possuem um maior metabolismo, com maior indução da secreção de aspártico-proteases. A pouca variação dos valores de microdureza no esmalte não exposto ao biofilme nos Grupos 1 ao 5, bem como em todo o Grupo 6 (controle do meio) comprova que a variação de pH do meio de cultura YCB suplementado com 1% de BSA não foi capaz de causar perda mineral significativa. Todos esses resultados nos levam a sugerir, portanto que, nas condições de metodologia empregadas no estudo, esta espécie apresenta algum potencial de desmineralização do esmalte. Isto também tem sido especulado por estudos prévios que suportam que a *C. albicans* possui potencial cariogênico e capacidade de

dissolver hidroxiapatita em grandes proporções (NIKAWA *et al.*, 1994; NIKAWA *et al.*, 2003).

Embora analisados apenas descritivamente, os resultados dos valores de MDT dos blocos dentais expostos a biofilme misto formado por espécies de *C. albicans* e não-*albicans* (Grupo 2, 3 e 4), apresentaram comportamento similar ao descrito para o Grupo 1. Porém, parece ter havido uma menor diminuição desses valores ao longo do experimento quando comparado com o grupo exposto apenas ao biofilme de *C. albicans*. Alguma competição entre as espécies de *Candida* pode estar ocorrendo quando da formação de biofilme misto, o que poderia teoricamente diminuir a atividade da espécie *C. albicans* no sistema (SAMARAMAYAKE *et al.*, 2007). Ainda, a capacidade de desmineralização do biofilme formado por *Candida* ATCC (Grupo 5) também foi menor quando comparado aos outros grupos, e apenas a partir do 10º dia, pode-se observar alguma diferença nos valores de microdureza quando comparadas as áreas expostas e não-expostas ao biofilme. Isolados referências, estocados em laboratório, podem com o passar do tempo de estoque, ter sua virulência diminuída, o que poderia explicar o resultado encontrado (BARBIERI *et al.*, 2007). No entanto, sua utilização é extremamente válida para comparação com isolados clínicos em estudos *in vitro*.

Concluindo, os resultados do presente estudo constataram a presença de leveduras em biofilme dental de crianças infectadas pelo HIV e demonstraram a capacidade de isolados de *Candida* spp. provenientes deste biofilme de causar desmineralização *in vitro*. Estudos que possam comprovar o potencial cariogênico e elucidar a exata participação dessas leveduras no desenvolvimento da doença cárie deverão ser desenvolvidos e serão de grande valia para o controle da doença nestes pacientes infectados pelo HIV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKDENIZ, B.G.; KOPARAL, E.; SEN B.H. ATES, M.; DENIZCI, A.A. Prevalence of *Candida albicans* in oral cavities and root canals of children. **ASDC J. Dent Child.**; 69(3); p. 289-92, 2002.

AMAECHEI, B.T.; HIGHAM, S.M.; EDGAR, W.M. Efficacy of sterilization methods and their effect on enamel desmineralization. **Caries Res.**; 32: p. 441-6, 1998.

ARENDORF, T.M.; WALKER, D.M. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. **Archs Oral Biol.**; v. 25; p. 1-10, 1980.

BARBIERI, D.S.V. *et. al.* Analysis of the *in vitro* adherence of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. **Brazilian Journal of Microbiology.**; 38: 624-631; 2007.

BJORNDAL, L.; LARSEN, T.; THYLSTRUP, A. A clinical and microbiological study of deep carious lesions during stepwise excavation using long treatment intervals. **Caries Res.**; 31; 1997.

BOSCO, V.L.; BIRMAN, E.G.; CURY, A.E.; PAULA, C.R. Yeasts from the oral cavity of children with AIDS: exoenzyme production and antifungal resistance. **Pesq Odontol Bras.**; v. 17, n. 3, p. 217-222, 2003.

CARLSTROM, D. Polarization microscopy of dental enamel with reference to incipient caries lesions. **Adv Oral Biol.**; v.1, p. 255-204, 1964.

CARVALHO, F.G.; SILVA, D.S.; HEBLING, J. *et al.* Presence of mutans streptococci and *Candida* spp. in dental plaque / dentine of carious teeth and early childhood caries. **Arch Oral Biol.**; v. 51, p. 1024-1028, 2006.

CARVALHO, F.G.; PARISOTTO, T.M.; HEBLING, J.; SPOLIDORIO, L.C.; SPOLIDORIO, D.M.P. Presence of *Candida* spp. in infants oral cavity and association with early childhood caries. **Bras J Oral Sci.**; V.6, n. 20, 2007.

CARVALHO, J.C.; THYLSTRUP, A.; EKSTRAND, H.R. Results after 3 years of nonoperative occlusal caries treatment of erupting first permanent molars. **Community Dent Oral Epidemiol.**; 20: 187-192,1992.

CASTRO, G.F.; PORTELA, M.; ESTEVES, C.; SOUZA, I.P. Oral manifestations and their correlation with clinical/immunological classification in HIV+ children. **J Dent Res.**; 79 (special issue), abstract 2692, 2000.

CASTRO, G.F.; SOUZA, I.P.R.; LOPES, S.; STASHENKO, P.; TELES, R.P. Salivary IgA to cariogenic bacteria in HIV-positive children and its correlation with caries prevalence and levels of cariogenic microorganisms. **Oral Microbiol Immunol.**; v. 19: p. 281-288, 2004.

CENTER FOR DISEASE CONTROL and PREVENTION – 1994 revised classification system for human immunodeficiency virus infection in children less than 13 years of age. **MMWR.**; v. 43, n. RR12, p. 1-10, 1994.

CERQUEIRA, D.F.; PORTELA, M.B.; POMARICO, L. *et al.* Dentinal carious lesions: A predisposing factor for the oral prevalence of *Candida* ssp. In HIV-infected children. **ASDC J Dent Child.**; v. 74, n. 2; p. 98-103, 2007.

CHENG, M.F.; YANG, Y.L.; YAO, T.J. Risk factors for fatal candidemia caused by *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species. **BMC Infectious Disease**, v. 5, n. 22, 2005.

CRAIG, R.G.; PEYTON, F.A. The microhardness of enamel and dentine. **J. dent. Res.**; 37: p. 661-668, 1958.

CURY, J.A.; VASQUES, R.A.; TABCHOURY, C.P.M.; TENUTA, L.M.A.; CURY, A.A. Effect of Frequency of Sucrose Exposure on Dental Biofilm Composition and Enamel Demineralization in the Presence of Fluoride. **Caries Research.**; 41: p. 9-15, 2007.

DIBDIN, G.H.; SHELLIS, R.P. Physical and biochemical studies of *Streptococcus mutans* sediments suggest new factors linking the cariogenicity of plaque with its extracellular polysaccharide content. **J Dent Res.**; 67: p. 890-5, 1988.

ELDRIDGE, K.; GALLAGHER, J.E. Dental caries prevalence and dental health behavior in HIV infected children. **Int J Paediatr Dent**, v. 10, n. 1, p. 19-26, 2000.

FEATHERSTONE, J.D.; TEN CATE, J.M.; SHARIATI, M.; ARENDS, J. Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. **Caries Res.**; 17: p. 385-391, 1983.

FLAITZ, C.M.; HICKS, M.J.; CARTER, A.B. *et al.* Saliva collection technique for cytologic, microbiologic and viral evaluation in pediatric HIV infection. **J Dent Child.**; v. 65, n. 5, p. 318-324, Sep./Oct., 1999.

FREZZINI, C.; LEAO, J.C.; PORTER, S. Current trends of HIV disease of the mouth. **J Oral Pathol Med.**; v. 34, p. 513-531, 2005.

GRABIS, K.; NAGY, G.; MADLENA, M.; DENES, Z.; MARTON, S.; KESZTHELYI, G.; BANOEZY, J. Associations between microbiological and salivary caries activity tests and caries experience in Hungarian adolescents. **Caries Res.**; 33 (3), p. 191-195, 1999.

GREENSPAN, J.S.; GREENSPAN, D. Oral manifestation of HIV infection and AIDS in: BRODER, S; MERIGAN, T.C & BOLOGNESI, D. **Textbook of AIDS Medicine.**; Baltimore; Ed. Williams & Wilkins, cap.33, p. 525-39, 1994.

HICKS, M.J.; CARTER, A.B.; ROSSMANN, S.N. *et al.* Detection of fungal organisms in saliva from HIV infected children; a preliminary cytologic analysis. **Pediatr Dent.**; 20(3): 1998.

HODGSON, T.A.; GREENSPAN, D.; GREENSPAN, J.S. Oral lesions of HIV disease and HARRT in industrialized countries. **Adv Dent Res.**; v. 19, p. 57-62, 2006a.

HODGSON, T.A.; NAIDOO, S.; CHIDZONGA, M. *et al.* Identification of oral health care needs in children and adults, Management of oral diseases. **Adv Dent Res.**; v. 19, p. 106-117, 2006b.

HODSON, J.J.; CRAIG, G.T. The incidence of *Candida albicans* in the plaques of teeth of children. **Dent Pract Dent Rec.**; Bristol, v.22, p. 296-301, 1972.

HOSSAIN, H.; ANSARI, F.; SCHULZ-WEIDNER, N. *et al.* Clonal identity of *Candida albicans* in the oral cavity and the gastrointestinal tract of pre-school children. **Oral Microbiol Immun.**; v. 18; p. 302-308, 2003.

JACOB, L.S.; FLAITSZ, C.M.; NICHOLS, M.; HICKS, J.M. Role of dentinal carious lesions in the pathogenesis of oral candidiasis in HIV infection. **JADA.**; v. 129: p. 187-194, 1998.

KEATING, J.; BJARNONSON, L.; SOMSUNDA, S. *et al.* Intestinal absorptive capacity, intestinal permeability and jejunal histology in HIV and their relation to diarrhoea. **Gut Londres.**; v.37, p. 623-9, 1995.

MACHADO, F.C. Avaliação da Clorexidina para controle de gengivite e *Candida* spp. em crianças infectadas pelo HIV. Orientador: Ivete Pomarico Ribeiro de Souza, Gloria Fernanda de Araujo Castro. Rio de Janeiro: UFRJ, 2007. **Dissertação (Mestrado em Odontopediatria)**

MAKIHIRA, S.; NIKAWA, H.; TAMAGAMI, M.; HAMADA, T. Bacterial and *Candidal* adhesion to intact and denatured collagen in vitro. **Mycoses.**; 45: p. 389–92, 2001.

MAKIHIRA, S.; NIKAWA, H.; TAMAGAMI, M.; HAMADA, T.; SAMARANAYAKE, L.P. Differences in *Candida albicans* adhesion to intact and denatured type I collagen in vitro. **Oral Microbiol Immunol.**; 17: p. 129–31, 2002.

MARCHANT, S.; BRASILSFORD, S.R.; TWOMWY, A.C.; ROBERTS, G.J.; BEIGHTON, D. The predominant microflora of nursing caries lesions. **Caries Res.**; Basel, v.35, n.6, p. 397-406, 2001.

MOALIC, E.; GESTALIN, A.; QUINIO, D.; GEST, P.E.; ZERILLI, A.; LE FLOHIC, A.M. The extent of oral fungal flora in 353 students and possible relationships with dental caries. **Caries Res.**; V.35; p.149-155, 2001.

MONDIN, M.E.B.G. Incidência de *Candida* spp. em crianças com cárie de mamadeira, antes e após o tratamento dental. 2003. 131f. **Tese (Mestrado em Biologia Buço - Dental)** – Faculdade de Odontologia, Universidade de Campinas, Piracicaba.

MORAES, A.P. Avaliação da Clorexidina para controle de gengivite e *Candida* spp. em crianças infectadas pelo HIV. Orientador: Ivete Pomarico Ribeiro de Souza, Orlando Chevitarese. Rio de Janeiro: UFRJ, 1998. **Dissertação (Mestrado em Odontopediatria)**.

NICOLATOU-GALITIS, O.; VELEGRAKI, A.; PAIKOS, S. *et al.* Effect of HAART on the prevalence of oral lesions in HIV-I infected patients. A Greek study. **Oral Dis.**; v. 10, p. 145-150, 2004.

NIKAWA, H.; YAMAMOTO, T.; HAYASHI, S.; NIKAWA, Y.; HAMADA, T. Growth and/or acid production of *Candida albicans* on soft lining materials in vitro. **J Oral Rehabil.**; 21: p. 585–94, 1994.

NIKAWA, H.; HAMADA, T.; YAMASHIRO, H.; MURATA, H.; SUBIWAHJUDI, A. The effect of saliva or serum on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* colonization of hydroxylapatite beads. **J Dent.**; 26: p. 31–37, 1998.

NIKAWA, H.; HAYASHI, S.; NIKAWA, Y.; HAMADA, T.; SAMARANAYAKE, L.P. Interactions between denture lining materials, protein pellicles and *Candida albicans*. **Arch Oral Biol.**; 38: p. 631–4, 1993.

NIKAWA, H.; YAMASHIRO, H.; MAKIHIRA, S. *et al.* *In vitro* cariogenic potential of *Candida albicans*. **Mycoses.**; v. 46, p. 471-478, 2003.

NISHIMURA, M.; NIKAWA, H.; YAMASHIRO, H.; HAMADA, T. Embery G Cell-associated collagen activity by *Candida albicans*. **Mycopathologia.**; 153: p. 125-8; 2002.

ODDEN, K.; SCHENCK, K.; HURLEN, B. High numbers of T cells in gingiva from patients wit human immunodeficiency virus (HIV) infection. **J Oral Pathol Med.**; v.24, p. 413-19, 1995

ODDS, F.C.; BERNAERTS, R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. **J Clin Microbiol.**; v. 32, n. 8; p. 1923-1929, 1994.

PATTERSON, M.K.J. Measurement of growth and viability of cells in culture. In: Meth Enzymol. (Jakoby, W. B. & Pastan, J. H., eds), New York, **Academic Press.**; 1979.

POMARICO, L.; PORTELA, M.B.; ROJAS, G.C.A.; SOUZA, I.P.R.; SOARES, R.M.A.; CASTRO, G.F. Cariogenic and erosive potential of the medication used by HIV-

infected children: pH and sugar concentration. **Community Dental Health.**; v. 25, p. 170-172, 2008.

PONGSIRIWET, S.; IAMAROON, A.; SRIBUREE, P. *et al.* Oral colonization of *Candida* species in perinatally HIV-infected children in Northern Thailand. **J Oral Science.**; v. 46, n. 2, p. 101-105, 2004.

PORTELA, M.B.; SOUZA, I.P.R.; COSTA, E.M.B. *et al.* Differential recovery of *Candida* species from subgingival sites in Human Immunodeficiency Virus-Positive and healthy children from Rio de Janeiro, Brazil. **J Clin Microbiol.**; v. 42, n. 12, p. 5925-5927, 2004.

RADFORD, J.R.; BALLANTYNE, H.M.; NUGENT, Z.; BEIGHTON, D.; ROBERTSON, M.; LONGBOTTOM, C. Caries-associated micro-organisms in infants from different socio-economic backgrounds in Scotland. **J Dent.**; 28(5), p. 307-312, 2000.

REGO, M.A.; KOGA-ITO, C.Y.; JORGE, A.O.C. Effects of oral environment stabilization procedures on counts of *Candida ssp.* in children. **Pesqui Odontol Bras**, v.17, n. 4, p.322-6, 2003.

RIBEIRO, A.A.; PORTELA, M.B.; SOUZA, I.P.R. Relação entre biofilme, atividade de cárie e gengivite em crianças HIV+. **Pesqui Odontol Brás.**; 16: p.144-50, 2002.

RIBEIRO, A.; THYLSTRUP, A.; SOUZA, I.P. VIANNA, R. Biofilme e atividade de cárie sua correlação em crianças HIV positiva.(Abstract) In: 16 **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica.**; São Paulo, 1999.

RICHARDSON, M.D. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. **J Antimicrob Chemo**, v. 56, suplemento S1, p. i5-i11, 2005.

RUIZ-EXTREMERA *et al.* Follow up of transmission of hepatitis C to babies of human immunodeficiency virus-negative women the role of breast – feeding in transmission. **Ped Infect Dis J.**; v.19, p. 511-516, 2000.

RUSSELL, C.; LAY, K.M. Natural of *Candida* species and yeasts in the oral cavities of infants. **Arch Oral Biol.**; Oxford, v.18, n. 8, p. 95, 1973.

SAMARANAYAKE, L.P.; GEDDES, D.A.M.; WEETMAN, D.A.; MAC-FARLANE, T.W. Growth and acid production of *Candida albicans* in carbohydrate supplemented media. **Microbios**, 37: p. 105–15, 1983.

SAMARANAYAKE, L.P.; HUGHES, A.; WEETMAN, D.A.; MACFARLANE, T.W. Growth and acid production of *Candida* species in human saliva supplemented with glucose. **J Oral Pathol.**; 15: p. 251–4, 1986.

SAMARANAYAKE, L.P.; SAMARANAYAKE, Y.H.; THEIN, Z.M. Characteristics of dual species *Candida* biofilms on denture acrylic surfaces. **Archs Oral Biol.** p.1200-1208; 2007.

SANTOS, L.C.; CASTRO, G.F.; SOUZA, I.P.; OLIVEIRA, R.H.S. Oral manifestations related to immunosuppression degree in HIV-positive children. **Braz Dent J.**; v. 12, n. 2, p. 135-138, 2001.

SOUZA, I.P.R.; TELES, G.S.; CASTRO, G.F.; PRIMO, L.G.; VIANNA, R.B.C.; PERES, M. Prevalência de cárie em crianças infectadas pelo HIV. **Revista Brasileira de Odontologia.**; V. 53, n.1, p. 49-51, Jan/Fev, 1996.

STARR, J.R.; WHITE, T.C.; LEROUX, B.G. *et al.* Persistence of oral *Candida albicans* carriage in healthy Portuguese schoolchildren followed for 3 years. **Oral Microbiol Immunol**, v. 17, p. 304-310, 2002.

SULLIVAN, D.; WESTWERNENG, T. J.; HAYNES, K. A. *et al.* *Candida dubliniensis* sp. nov. Phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidiasis in HIV-infected individuals. **Microbiology**, v. 141, pt. 7, p. 1507-21, Jul., 1995.

SZIEGOLEIT, F.; SZIEGOLEIT, A.; WETZEL, W.E. Effect of dentário treatment and/or local application of amphotericin B to carious teeth on oral colonization by *Candida*. **Med Mycol**, v. 37, n. 5, p. 345-350, 1999.

TEN CATE, JACOB, M.; TSUTOMU, TAKATSUKA & ROB, A.; EXTERKATE, M. Effects of Isomalt on enamel de- and remineralization, a combined in vitro pH-cycling model and in situ study. **Clin Oral Invest.**;12: p. 173–177; 2008.

Quadro 1: Descrição dos escores do Índice de Biofilme (RIBEIRO *et al.*, 2002).

Escore 0: Ausência de biofilme visível
Escore 1: Biofilme fino somente em dentes anteriores
Escore 2: Biofilme fino, difuso e facilmente removido, distribuído em dentes anteriores e posteriores
Escore 3: Biofilme espesso e firmemente aderido somente em dentes anteriores ou posteriores
Escore 4: Biofilme espesso e firmemente aderido em dentes anteriores e fino em posteriores ou biofilme espesso e firmemente aderido em dentes posteriores e fino em dentes anteriores
Escore 5: Biofilme espesso e firmemente aderido em dentes posteriores e anteriores

Tabela 1: Condições sistêmicas dos pacientes infectados pelo HIV (n=50) de acordo com critério CDC (1994).

Imunossupressão*			AIDS		Terapia Antiretroviral		HAART (n=27)	
1	2	3	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não
21 (42%)	18 (36%)	11 (22%)	11 (22%)	39 (78%)	27 (54%)	23 (46%)	21 (42%)	6 (12%)

* Sistema de Classificação da infecção pelo HIV, em crianças e adolescentes menores de 13 anos de idade (CDC, 1994): 1) Ausência de Imunossupressão (CD4 > 25%); 2) Imunossupressão moderada (CD4 = 15-24%); 3) Imunossupressão grave (CD4 < 15%).

Tabela 2: Distribuição das crianças de acordo com as espécies de *Candida* isoladas (classificação quanto ao número de ufc/mL) no biofilme.

<i>Candida</i> spp.	Classificação do crescimento (ufc/mL)					Total de crianças
	Ausente	Muito escasso (<10)	Escasso (10-10 ²)	Moderado (10 ² -10 ³)	Numeroso (>10 ³)	
<i>C. albicans</i>	---	---	9	14	27	50
<i>C. parapsilosis</i>	---	---	2	2	4	8
<i>C. tropicalis</i>	---	---	1	---	2	3
<i>C. glabrata</i>	---	---	---	---	1	1

Tabela 3: Relação entre a média de ufc/mL de *Candida* spp. isoladas do biofilme de crianças infectadas pelo HIV e o índice de biofilme

	Índice de Biofilme			
	3	4	5	P valor (ANOVA)
<i>Candida</i> spp. Média (± d.p) (ufc/mL)	174,4 ± 87,1	272,6 ± 114,3	282,2 ± 83,2	0,048
<i>C. albicans</i> Média (± d.p) (ufc/mL)	174,2 ± 87,0	258,0 ± 114,4	269,7 ± 83,6	0,08

Tabela 4: Relação entre o número de ufc/mL de *Candida* spp. e *C. albicans* e presença da doença cárie.

	Presença de Cárie		
	Sim	Não	P valor (MannWhitney)
<i>Candida</i> spp. Média (± d.p) (ufc/mL)	259,1 ± 105,5	278,0 ± 104,6	0,64
<i>C. albicans</i> Média (± d.p) (ufc/mL)	248,0 ± 106,5	263,2 ± 91,09	0,82

Tabela 5: Relação entre o número de manchas brancas ativas e cavidades ativas em esmalte e classificação do crescimento de *Candida* spp. Isoladas do biofilme.

Média (± d.p)	Classificação do Crescimento (ufc/mL)			
	Escasso (10^1 - 10^2)	Moderado (10^2 - 10^3)	Numeroso ($>10^3$)	p-valor ANOVA
MBA	2,33 ± 1,65	2,07 ± 1,85	3,44 ± 2,29	p=0,10
CAE	0,55 ± 1,13	0,57 ± 1,22	0,81 ± 1,17	p=0,51
MBA + CAE	2,88 ± 2,47	2,64 ± 2,87	4,27 ± 2,96	p=0,18

* MBA: mancha branca ativa; CAE: cavidade ativa em esmalte

Tabela 6: Valores médios de MDT do esmalte decíduo de acordo com os grupos e tempo de experimento

Grupo 1: biofilme formado por *C. albicans*; **Grupo 2:** biofilme misto (*C. albicans* e *C. tropicalis*); **Grupo 3:** biofilme misto (*C. albicans* e *C. parapsilosis*); **Grupo 4:** biofilme misto (*C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*); **Grupo 5:** biofilme formado por *C. albicans* (ATCC 24433); **Grupo 6:** ausência de biofilme de *Candida* (controle do meio).

Dia	Grupo 1 (n=70)		Grupo 2 (n=14)		Grupo 3 (n=14)		Grupo 4 (n=14)		Grupo 5 (n=14)		Grupo 6 (n=14)	
	¹ Md ± d.p	² Md ± d.p	¹ Md ± d.p	² Md ± d.p	¹ Md ± d.p	² Md ± d.p	¹ Md ± d.p	² Md ± d.p	¹ Md ± d.p	² Md ± d.p	¹ Md ± d.p	² Md ± d.p
1°	311,4±12,2	317,7±19,4	324,5±6,9	321,0±10,8	320,8±1,1	336,9±3,6	330,5±8,2	344,1±14,7	327,2±12,9	326,1±12,0	334,0±4,9	345,2±36,0
3°	305,6±17,8	302,5±18,7	310,7±20,0	315,4±25,7	335,7±1,07	350,1±34,2	322,9±2,4	314,7±13,9	314,6±5,3	317,8±4,8	327,0±25,8	330,4±23,1
5°	304,7±9,4 ^a	284,8±28,7 ^a	307,9±13,2	245,9±13,46	332,6±1,2	287,9±15,3	335,5±5,7	255,29±7,8	327,1±10,0	323,8±12,2	325,6±6,5	338,5±1,47
8°	302,3±8,9 ^b	199,3±29,0 ^b	328,1±4,5	241,0±32,3	318,7±6,2	240,0±1,5	324,9±17,9	249,9±23,2	337,0±19,0	329,7±15,3	307,1±3,02	337,8±1,99
10°	301,9±10,8 ^c	173,3±20,3 ^c	318,7±8,1	233,3±26,3	322,9±3,3	235,82±7,2	323,8±8,9	234,8±11,6	334,6±1,8	231,3±13,9	309,0±4,6	332,6±3,92
12°	296,1±12,5 ^d	153,9±20,1 ^d	336,2±12,2	214,7±1,8	335,0±20,0	223,6±2,6	327,8±2,1	212,9±11,53	331,1±10,9	238,0±3,0	310,4±10,2	333,6±13,1
15°	300,0±14,9 ^e	145,6±13,6 ^e	339,7±1,3	210,5±13,1	326,5±4,0	221,5±6,4	316,2±17,5	206,4±12,2	326,8±7,3	227,0±18,1	307,9±7,6	319,0±20,0
ANOVA p valor	0, 218	0, 000	0, 141	0, 003	0, 315	0, 0001	0, 698	0, 0002	0, 553	0, 0001	0, 214	0, 868

¹ Média e ±d.p dos valores de dureza Knoop (KHN) do esmalte não-exposto ao biofilme

² Média e ±d.p dos valores de dureza Knoop (KHN) do esmalte exposto ao biofilme

Teste Mann-Whitney. ^a p=0,04; ^b p=0,0002; ^c p=0,0002; ^d p=0,0002; ^e p=0,0002

Figura 1: Perda mineral (concentração de íons cálcio $\mu\text{g}/\text{mL}$ liberado na suspensão) durante a formação de biofilme por *C. albicans in vitro* nos diferentes dias.

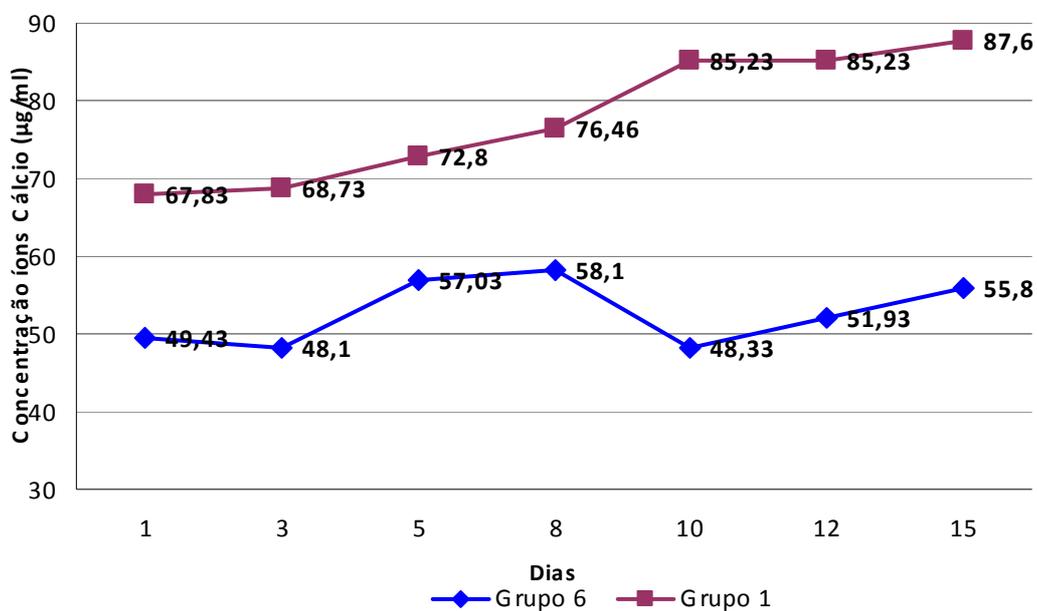
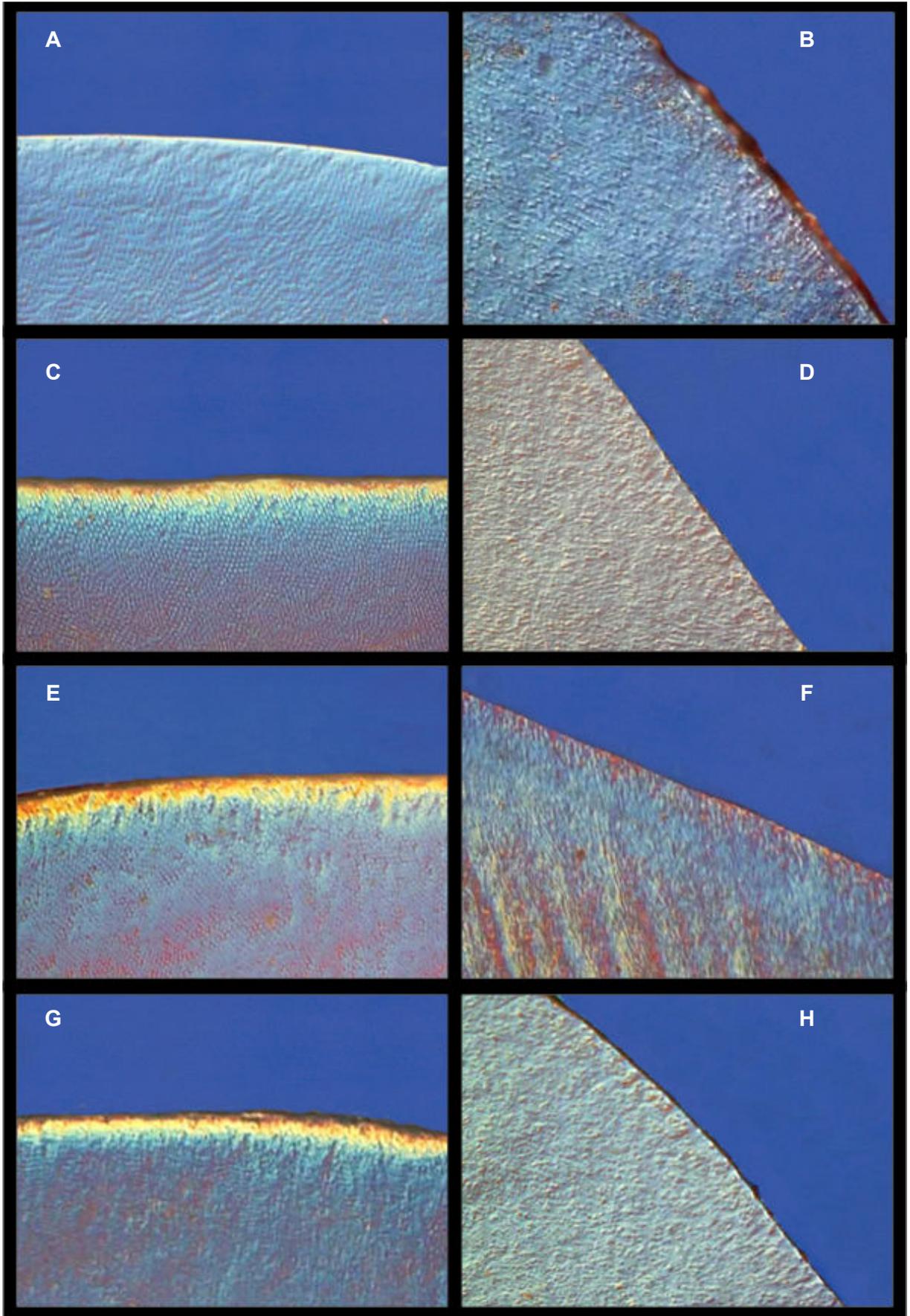


Figura 2: Imagens de MLP dos blocos de esmalte do Grupo 1. As imagens A, C, E, G, são as áreas de esmalte expostas ao biofilme de *C. albicans* no 1º, 5º, 8º e 15º dia respectivamente. As imagens B, D, F, H, representam os respectivos controles (áreas não-expostas ao biofilme).



5. DISCUSSÃO

As manifestações bucais têm sido relatadas como sendo os primeiros indicadores da infecção pelo HIV (SANTOS *et al.*, 2001; NAIDOO & CHIKTE, 2004; COOGAN *et al.*, 2005; HODGSON *et al.*, 2006a), e dentre as mais comumente encontradas em crianças infectadas pelo HIV, a candidíase bucal, é a lesão de maior prevalência, possuindo alto valor preditivo para a evolução da mesma (CASTRO, 1998; PORTELA *et al.*, 2000, RIBEIRO, 2000; JABRA-RIZK *et al.*, 2000; PONGSIRIWET *et al.*, 2004; FREZZINI *et al.*, 2005; CHALLACOMBE *et al.*, 2006; HODGSON *et al.*, 2006a; CERQUEIRA *et al.*, 2007). No entanto, após o uso da terapia antiretroviral combinada com drogas inibidoras de proteases do HIV (HAART), observou-se um notável declínio não somente da candidíase bucal, como também de outros tipos de lesões oportunistas nestes pacientes (PATTON *et al.*, 2000; FREZZINI *et al.*, 2005; WHO, 2005; HODGSON *et al.*, 2006b; YANG *et al.*, 2006).

Crianças infectadas pelo HIV também apresentam alta prevalência da doença cárie, principalmente quando comparadas às crianças não-infectadas (CASTRO *et al.*, 2004; HODGSON *et al.*, 2006a; CERQUEIRA *et al.*, 2007). De acordo com nossos resultados, observou-se uma alta prevalência desta doença (n=41, 82%) nas crianças examinadas. Neste sentido, é importante ressaltar que estes pacientes representam um grupo especial, em que muitos fatores moduladores da doença cárie tais como dieta rica em carboidratos (SOUZA *et al.*, 1996; RIBEIRO *et al.*, 2002), alto teor de sacarose presente nos medicamentos ingeridos (GREENSPAN & GREENSPAN, 1994; RIBEIRO *et al.*, 2002) e imunossupressão devido a progressão da infecção pelo HIV (SOUZA *et al.*, 1996; ELDRIDGE & GALLAGHER, 2000;

CASTRO *et al.*, 2004; FREZZINI *et al.*, 2005) estão presentes. Além destes também podem ser citados as alterações no fluxo salivar pelo uso de medicamentos e/ou por alterações de glândulas salivares (RIBEIRO *et al.*, 1998) e repetidos episódios de internação (RIBEIRO *et al.*, 2002), como fatores associados que fazem parte do cotidiano de vida de tais crianças. Alguns destes fatores podem ser trabalhados e modificados com a educação em saúde bucal, porém o mesmo não pode ser feito com aqueles advindos da condição sistêmica como, por exemplo, a dieta e imunidade. Cabe ressaltar também que o quadro de infecções bucais recorrentes predispõe as crianças ao maior risco de desenvolvimento da doença cárie, favorecido pela negligência quanto aos procedimentos de higiene bucal, atribuídos a sintomatologia dolorosa evidenciadas por essas lesões.

O biofilme dental de pacientes imunocomprometidos foi estudado por BROWN *et al.* (1979). Os autores observaram que a composição de microorganismos no biofilme dental de pacientes com alterações imunológicas difere da composição do biofilme de pacientes saudáveis. Esta diferença se expressou significativamente em relação à grande quantidade de *Candida* spp. sobretudo a espécie *C. albicans*, presente no biofilme dental destes pacientes. No entanto, similar ao estudo de COSTA *et al.* (2006), que analisaram de swab de língua, não foi encontrada associação entre imunossupressão e uso de HAART, com a prevalência de *Candida* spp. oriundas do biofilme supragengival no presente estudo. Talvez isto se deva ao fato de que a maioria das crianças da amostra apresentava um quadro de imunossupressão controlado e estava sob uso do HAART.

RUSSELL & LAY (1973), avaliaram a freqüência de *C. albicans* no biofilme dental em crianças de 3 a 6 anos com higiene bucal deficiente e alta prevalência da

doença cárie e observaram que a prevalência de *C. albicans* no biofilme dental foi de 29%. Estudos apontam que a *C. albicans* é a espécie mais prevalente em biofilme dental e saliva de crianças cárie-ativas do que em crianças livres de cárie (HODSON & CRAIG, 1972; ARENDORF & WOLKER, 1980; RADFORD *et al.*, 2000). Com o objetivo de investigar o tratamento dentário sobre a prevalência de *Candida* spp. em crianças saudáveis apresentando cárie de mamadeira, bem como identificar as espécies relacionadas, MONDIN (2003) avaliou amostras intrabucais (mucosa, dorso da língua, palato, biofilme dental e saliva) de crianças com cárie e sem cárie. O resultado demonstrou que houve maior prevalência de *Candida* spp. em crianças com cárie de mamadeira preferencialmente no biofilme e a espécie predominante foi *C. albicans*. HOSSAIN *et al.* (2003), avaliaram a associação de genótipos de *C. albicans* que colonizavam lesões de cárie, através de amostras de saliva, biofilme dental, cárie e fezes. Todas as espécies identificadas foram a *C. albicans* e embora presentes no biofilme, uma maior prevalência foi encontrada nas lesões de cárie. CARVALHO *et al.*, (2006), avaliando a presença de *Candida* spp. em amostras de biofilme supragengival e lesões cariosas em dentina de crianças saudáveis com cárie de acometimento precoce e crianças livres de cárie, observou que *C. albicans* foi mais prevalente (60,4%) nas crianças com cárie quando comparada as crianças livres de cáries, independente do sítio de coleta.

O nosso estudo teve como objetivo determinar a prevalência de espécies de *Candida* oriundas do biofilme supragengival de crianças infectadas pelo HIV, até o presente momento sem relatos na literatura consultada. Todas as crianças no presente estudo apresentaram crescimento positivo (n=50, 100%) para *Candida* spp. no biofilme supragengival e de todas as espécies identificadas a mais prevalente foi a *C. albicans* (n=50, 100%), seguida da *C. parapsilosis*. Um estudo analisando

raspado de mucosa, realizado por COSTA (2001), também observou que a *C. albicans* seguida da *C. parapsilosis* foram as mais prevalentes na cavidade bucal de crianças infectadas pelo HIV e de crianças saudáveis. Outros estudos (RUSSEL & LAY, 1973; DARWAZEH & AL-BAHIR, 1995; LEINEGGER *et al.*, 1996) realizados em crianças saudáveis, também demonstraram a *C. albicans* e a *C. parapsilosis* como as espécies de leveduras mais comumente isoladas da cavidade bucal de crianças saudáveis.

Ao avaliar a relação entre o índice de biofilme supragengival e a colonização das leveduras neste biofilme, constatou-se que, quanto maior a quantidade de biofilme sobre as superfícies dentais, ou seja, presença tanto em dentes anteriores como em dentes posteriores (escore 5), maior o número de ufc/mL de *Candida* spp. ($p=0,048$), o mesmo sendo observado para *C. albicans*, embora não estatisticamente significativa. A presença de biofilme dental abundante sobre essas superfícies pode ser justificada pela má qualidade da escovação dental das crianças da amostra. Esse acúmulo de biofilme poderia então atuar como um fator coadjuvante para a colonização preferencial por *Candida* spp. nestes pacientes. Isto poderia também prolongar as condições de baixo pH no biofilme dental e favorecer a seleção de microorganismos com potencial acidogênico como a *C. albicans* (SAMARANAYAKE *et al.*, 1983; SAMARANAYAKE *et al.*, 1986; NIKAWA *et al.*, 1993; NIKAWA *et al.*, 1994; NIKAWA *et al.*, 2003). Cabe ressaltar também que, a amostra do presente estudo foi coletada da região cervical das superfícies dentais, que geralmente é banhada não somente pela saliva, como também por componentes do exsudato ou soro derivado dos fluídos subgengivais e segundo NIKAWA *et al.* (1996), este último tem demonstrado aumentar a aderência fúngica ao biofilme.

A associação entre a presença de *Candida* spp. na cavidade bucal e a cárie dentária tem sido relatada na literatura por vários autores (SZIEGOLEIT *et al.*, 1999; AKDENIZ *et al.*, 2002; REGO *et al.*, 2003). No entanto, poucos estudos têm sido realizados para verificar a possível participação desta levedura no desenvolvimento do processo cariioso. Existem evidências de estudos *in vitro* que a *C. albicans* possui propriedade de dissolver hidroxiapatita em grandes proporções (NIKAWA *et al.*, 2003). Além disso, parece possuir atividade colagenolítica (NISHIMURA *et al.*, 2002), aderindo-se tanto ao colágeno intacto como ao colágeno desnaturado por diferentes mecanismos. Isto contribui para a persistência da levedura na superfície da hidroxiapatita dissolvida, devido ao colágeno exposto e a alta capacidade de aderência a ele, servindo como um sítio de aderência e colonização (MAKIHIRA *et al.*, 2001; MAKIHIRA *et al.*, 2002; NIKAWA *et al.*, 2003). Além disso, SEN *et al.* (1997), analisando o padrão de colonização de *C. albicans* em espécimes de esmalte dental, dentina e cimento, observaram através de microscopia eletrônica de varredura, que hifas de *C. albicans* podem penetrar em micro-trincas da superfície dental, migrando para o interior dos túbulos dentinários. Isto confirma o quão bem colonizado pode estar o esmalte dental por esta levedura.

NIKAWA *et al.* (2001) testaram a alteração da coaderência de *C. albicans* associada a bactérias bucais (*S. mutans*, *S. sanguis*, *S. sobrinus*, *S. salivarius*, *Lactobacillus* e *Actinomyces*). Para este experimento, isolados de *C. albicans* associados a bactérias bucais foram incubados em meio suplementado com glicose. Os autores observaram a coaderência para todos os isolados de *S. mutans* e *S. sanguis*, porém não houve coadesão significativa para *S. sobrinus*, *S. salivarius*, *Lactobacillus* e *Actinomyces*. Contudo quando as leveduras foram pré-incubadas em meio suplementado com galactose, as leveduras coaderiram com *S. salivarius* e

Actinomyces. Esta coagregação de *C. albicans* com bactérias bucais pode ser considerada um fator importante na ecologia de biofilmes bucais, e a presença de açúcares alterando a coaderência da levedura podem contribuir para sua sobrevivência e manutenção nas diferentes superfícies bucais.

Nenhum estudo experimental até o presente momento verificou a possível participação de espécies de *Candida* isoladas do biofilme supragengival de crianças infectadas pelo HIV, no desenvolvimento do processo carioso. Portanto, o presente estudo visou, através de seu modelo experimental idealizado, testar o potencial de desmineralização *in vitro* por espécies de *Candida* em blocos dentais de esmalte decíduo. Os resultados avaliados através de métodos quantitativos e qualitativos constataram que após serem submetidos à formação de biofilme por *C. albicans* (Grupo 1), os blocos de esmalte decíduo apresentaram perda mineral observada pela diminuição significativa dos valores de microdureza transversal (Tabela 6 – pag. 53) e também nas imagens de MLP, nas áreas expostas ao biofilme, à partir do 5º dia. Apesar do pouco conhecimento sobre a possível participação desta levedura no desenvolvimento do processo carioso, principalmente em lesões de cárie incipientes (lesões de mancha branca), nosso estudo constatou que esta espécie apresentou potencial de desmineralização do esmalte, corroborando com estudos prévios que suportam que a *C. albicans* pode possuir algum potencial cariogênico devido a possibilidade de dissolver hidroxapatita em grandes proporções (NIKAWA *et al.*, 2003).

Quando espécies de *C. albicans* e *Candida* não-*albicans* foram associadas para formação de biofilme (Grupos 2, 3 e 4), os blocos de esmalte apresentaram comportamento similar ao descrito para o Grupo 1, ou seja, também apresentaram desmineralização conferida pela diminuição dos valores de microdureza transversal

nas áreas expostas ao biofilme, à partir do 5º dia. No entanto, ressalta-se que nesses grupos não foram realizados testes estatísticos devido ao reduzido número de blocos de esmalte (dois fragmentos de esmalte correspondente a cada dia). O potencial de desmineralização do biofilme formado por *C. albicans* ATCC (Grupo 5) parece ter sido reduzido, e apenas a partir do 10º dia, pode-se observar alguma diferença nos valores de microdureza quando comparadas áreas expostas ao biofilme e não-expostas. Apesar deste meio apresentar um pH crítico (5,5) com relação a doença cárie, os nossos resultados mostram que não houve variações significativa nos valores de microdureza do esmalte expostos ao meio de cultura.

Com o objetivo de analisar *in vitro* a diferença do potencial de desmineralização de *C. albicans* isoladas de diferentes sítios da cavidade bucal, foi realizado o estudo preliminar apresentado no artigo 1. Para tal, selecionou-se um isolado da mucosa bucal e um de lesão cariada cavitada em dentina de uma criança infectada pelo HIV. Observou-se significativa diminuição dos valores médios de microdureza em relação aos diferentes dias em esmalte de dentes permanentes expostos ao biofilme formado. No entanto, verificou-se significativa diminuição dos valores de microdureza após o 5º dia no grupo 1 (isolados de *C. albicans* da mucosa bucal). Quando comparado aos valores de microdureza observados no grupo 2 (isolados de *C. albicans* de lesões cavitadas em dentina) constatou-se que houve diminuição dos valores de microdureza a partir do 3º dia de formação do biofilme. Essa diferença poderia estar relacionada ao fato das amostras serem de diferentes sítios da dentro da cavidade bucal. JIN *et al.* (2005), observaram uma frequência de 1% de variabilidade fenotípica em biofilmes de *C. albicans* quando comparado a células planctônicas. Os autores sugerem que as diferenças observadas nos

diferentes fenótipos de *C. albicans* estão relacionadas ao padrão de assimilação de carboidratos, adesão, formação de biofilme, diferenciação e crescimento celular.

Portanto, com base nos resultados apresentados na presente pesquisa, torna-se evidente a necessidade de investigações adicionais com números maiores de amostras a fim de determinar a real importância entre a desmineralização do esmalte por biofilmes bucais com espécies de *Candida*. Assim como, a sua possível participação no desenvolvimento do processo cariioso.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

1. Todas as crianças apresentaram crescimento positivo para *Candida* spp. (n=50, 100%) no biofilme supragengival. De todas as espécies isoladas e identificadas a mais prevalente foi a *C. albicans* (n=50, 100%), seguida por *C. parapsilosis* (n=8, 16%), *C. tropicalis* (n=3, 6%) e *C. glabrata* (n=1, 2%).

2. Observou-se que quanto maior a quantidade de dentes com biofilme espesso, maior a quantidade de *Candida* spp. O mesmo não foi observado para *C. albicans*. Também não foram observadas diferenças no número de ufc/mL de *Candida* spp. em relação doença cárie, imunossupressão e uso de HAART.

3. Espécies de *Candida* isoladas do biofilme supragengival de crianças infectadas pelo HIV, apresentaram potencial de desmineralização, *in vitro*, sobre o esmalte decíduo e permanente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKDENIZ, B.G.; KOPARAL, E.; SEN, B.H.; ATES, M.; DENIZCI, A.A. Prevalence of *Candida albicans* in oral cavities and root canals of children. **ASDC J Dent Child.**; 69(3), p.289-92, 2002.

AMAECHI, B.T.; HIGHAM, S.M.; EDGAR, W.M. Efficacy of sterilization methods and their effect on enamel desmineralization. **Caries Res.**; 32: p.441-6, 1998.

ARENDORF, T.M.; WALKER, D.M. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. **Archs Oral Biol.**; v. 25; p.1-10, 1980.

BAGG, J.; SILVERWOOD, R.W. Coagglutination reactions between *Candida albicans* and oral bacteria. **J Med Microbiol.**; v. 22; p.165-169, 1986.

BARBIERI, D.S.V. *et al.* Analysis of the *in vitro* adherence of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. **Brazilian Journal of Microbiology.**; 38: p.624-631, 2007.

BARCHIESI, F.; MARACCI, M.; RADII, B. *et al.* Point prevalence, microbiology and fluconazole susceptibility patterns of yeast isolates colonizing the oral cavities of HIV-infected patients in the era of highly active antiretroviral therapy. **J Antimicrob Chemo.**; v. 50, p. 999-1002, Sep, 2002.

BJORNDAL, L.; LARSEN, T.; THYLSTRUP, A. A clinical and microbiological study of deep carious lesions during stepwise excavation using long treatment intervals. **Caries Res.**; 31: p.411-17, 1997.

BOSCO, V.L.; BIRMAN, E.G.; CURY, A.E.; PAULA, C.R. Yeasts from the oral cavity of children with AIDS: exoenzyme production and antifungal resistance. **Pesq Odontol Bras.**; v. 17, n. 3, p. 217-222, 2003.

BROWN, L.R.; MACKLER, B.F.; LEVY, B.M. *et al.* Comparison of the plaque microflora in immunodeficient and immunocompetent dental patients. **J Dental Res.**; V.58, n. 12, p. 2344 – 52, 1979.

CARLSTROM, D.; Polarization microscopy of dental enamel with reference to incipient caries lesions. **Adv Oral Biol.**; v.1, p. 255-204, 1964.

CARVALHO, F.G.; PARISOTTO, T.M.; HEBLING, J.; SPOLIDORIO, L.C.; SPOLIDORIO, D.M.P. Presence of *Candida* spp. in infants oral cavity and association with early childhood caries. **Bras J Oral Sci.**; V.6, n.20, 2007.

CARVALHO, F.G.; SILVA, D.S.; HEBLING, J. *et al.* Presence of mutans streptococci and *Candida* spp. in dental plaque / dentine of carious teeth and early childhood caries. **Arch Oral Biol**, v. 51, p. 1024-1028, 2006.

CARVALHO, J. C.; THYLSTRUP, A.; EKSTRAND, H. R. Results after 3 years of nonoperative occlusal caries treatment of erupting first permanent molars. **Community Dent Oral Epidemiol**, 20: 187-192, 1992.

CASSONE, A.; TACCONELLI, E.; BERNARDIS, F. Antiretroviral therapy with protease inhibitors has an early, immune reconstitution-independent beneficial effect on *Candida* virulence and oral candidiasis in Human Immunodeficiency Virus-infected subjects. **J Infect Dis.**; v. 185, p.188-195, 2002.

CASTRO, G.F. Correlação entre manifestações bucais e classificação clínica e imunológica em crianças infectadas pelo HIV. 1998. 141 p. **Dissertação (Mestrado em Odontologia)** - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

CASTRO, G.F.; PORTELA, M.; ESTEVES, C.; SOUZA, I. P. Oral manifestations and their correlation with clinical/immunological classification in HIV+ children. **J Dent Res.**; 79 (special issue), abstract (2692); 2000.

CASTRO, G.F.; SOUZA, I.P.R.; LOPES, S.; STASHENKO, P.; TELES, R.P. Salivary IgA to cariogenic bacteria in HIV-positive children and its correlation with caries prevalence and levels of cariogenic microorganisms. **Oral Microbiol Immunol**, v. 19: p. 281-288, 2004.

CENTER FOR DISEASE CONTROL and PREVENTION – 1994 revised classification system for human immunodeficiency virus infection in children less than 13 years of age. **MMWR.**, v. 43, n. RR12, p. 1-10, 1994.

CERQUEIRA, D.F.; PORTELA, M.B.; POMARICO, L. *et al.* Dentinal carious lesions: A predisposing factor for the oral prevalence of *Candida* ssp. In HIV-infected children. **ASDC J Dent Child.**; v. 74, n. 2; p. 98-103, 2007.

CHALLACOMBE *et al.* Overview and research agenda arising from the 5th world workshop on oral health and disease in AIDS. **Adv Dent Res.**; v. 19, p. 5-9, 2006.

CHENG, M.F.; YANG, Y.L.; YAO, T.J. Risk factors for fatal candidemia caused by *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species. **BMC Infectious Disease**, v. 5, n. 22, 2005.

CHIGURUPATI, R.; RAGHAVAN, S.S.; STUDEN-PAVLOVICH, D.A. Pediatric HIV infection and its oral manifestations: a review. **Pediat Dent.**; v. 18, n. 2; p. 106-113, 1996.

COOGAN, M.M.; GREENSPAN, J.G.; CHALLACOMBE, S.J. Oral lesions in infection with human immunodeficiency virus. **Bulletin World Health Organization.**; v. 83, n. 9, p. 700-706, 2005.

COSTA, E.M.M.B.; SANTOS, A.L.S.; CARDOSO, A. S. *et al.* Heterogeneity of metallo and serine extracellular proteases in oral clinical isolates of *Candida albicans* in HIV-positive and healthy children from Rio de Janeiro. **FEMS Immunol Med Microbiol.**; v.38: p. 173-180, 2003.

COSTA, Edja Maria Melo de Brito. Estudo comparativo da prevalência e da expressão de proteases entre as espécies de *Candida* isoladas na mucosa bucal saudável de crianças infectadas e não infectadas pelo HIV. **Tese (Doutorado em Odontologia)**. 168 p., Orientadores: Abel Silveira Cardoso e Rosângela Maria de Araújo Soares. Rio de Janeiro: UFRJ, 2001.

CRAIG, R.G.; PEYTON, F.A. The microhardness of enamel and dentine. **J Dent Res.**; 37: p. 661-668, 1958.

CURY, J.A.; VASQUES, R.A.; TABCHOURY, C.P.M.; TENUTA, L.M.A.; CURY, A.A. Effect of Frequency of Sucrose Exposure on Dental Biofilm Composition and Enamel Demineralization in the Presence of Fluoride. **Caries Research.**; 41: p. 9-15, 2007.

DARWAZEH, A.M.; AL-BASHIR, A. Oral *Candidal* flora in healthy infants. **J Oral Pathol Med.**; Copenhagen, v. 24, n. 8, p. 361-364, 1995.

ELDRIDGE, K.; GALLAGHER, J.E. Dental caries prevalence and dentário health behaviour in HIV infected children. **Int J Paediatr Dent.**; v. 10, n. 1, p. 19-26, 2000.

EYESON, J.D.; TENANT-FLOWERS, M.; COOPER, D.J. *et al.* Oral manifestations of an HIV positive cohort in the era of highly active anti-retroviral therapy (HAART) in South London. **J Oral Pathol Med.**; v. 31, p. 169-174, 2002.

FEATHERSTONE, J.D.; TEN CATE, J.M.; SHARIATI, M.; ARENDS, J. Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. **Caries Res.**; 17: p.385-391, 1983.

FREZZINI, C.; LEAO, J.C.; PORTER, S. Current trends of HIV disease of the mouth. **J Oral Pathol Med.**; v. 34, p. 513-531, 2005.

GREENSPAN, D.; GREENSPAN, J.S. Oral manifestations of Human Immunodeficiency Virus infection. **Dent Clin North Amer.**; v. 37, n. 1, p. 21-32, Jan., 1993.

GREENSPAN, J.S.; GREENSPAN, D. Oral manifestation of HIV infection and AIDS in: BRODER, S.; MERIGAN, T.C & BOLOGNESI, D. **Textbook of AIDS Medicine**, Baltimore; Ed. Williams & Wilkins, cap.33, p. 525-39, 1994.

HICKS, M.J.; CARTER, A.B.; ROSSMANN, S.N. *et al.* Detection of fungal organisms in saliva from HIV infected children; a preliminary cytologic analysis. **Pediatr Dent.**; 20(3): p. 1628, 1998.

HODGSON, T.A.; GREENSPAN, D.; GREENSPAN, J.S. Oral lesions of HIV disease and HARRT in industrialized countries. **Adv Dent Res.**; v. 19, p. 57-62, 2006a.

HODGSON, T.A.; NAIDOO, S.; CHIDZONGA, M. *et al.* Identification of oral health care needs in children and adults, Management of oral diseases. **Adv Dent Res**, v. 19, p. 106-117, 2006b.

HODSON, J.J.; CRAIG, G.T. The incidence of *Candida albicans* in the plaques of teeth of children. **Dent Pract Dent Rec.**; Bristol, v.22, p. 296-301, 1972.

HOLMES, A.R.; CANNON, R.D.; JENKINSON, H.F. Interactions of *Candida albicans* with bacteria and salivary molecules in oral biofilms. **J Ind Microbiol.**; 15, p. 208-213, 1995.

HOLMES, A.; RODERICK, M.C.N.; HOWARD, F.; JENKINSON. *Candida albicans* Binding to the oral bacterium *Streptococcus gordonii* Involves Multiple Adhesin-Receptor Interactions. **Infection Immunity.**; 64: p. 4680–85, 1996.

HOSSAIN, H.; ANSARI, F.; SCHULZ-WEIDNER, N. *et al.* Clonal identity of *Candida albicans* in the oral cavity and the gastrointestinal tract of pre-school children. **Oral Microbiol Immun.**; v. 18; p. 302-308, 2003.

JABRA-HIZK, M.A.; FALKER, W.A.; MERZ, W.G. *et al.* Retrospective identification and characterization of *Candida dubliniensis* isolates among *Candida albicans* clinical laboratory isolates from Human Immunodeficiency Virus (HIV)-infected and non-infected individuals. **J Clin Microbiol.**; v. 38, n. 6, p. 2423-2426, June, 2000.

JENKINSON, H.F.; LALA, H.C.; SHEPHERD, M.G. Coaggregation of *Streptococcus sanguis* and other streptococci with *Candida albicans*. **Infect Immun.**; 58, p. 1429-1436, 1990.

JIN, Y.; SAMARANAYAKE, Y.H.; YIP, H.K. *et al.* Characterization of switch phenotypes in *Candida albicans* biofilms. **Mycopathologia.**; v. 160, n. 3; p. 191-200, 2005.

KERDPON, D.; PONGSIRIWET, S.; PANGSOMBOOM, K. *et al.* Oral manifestations of HIV infection in relation to clinical and CD4 immunological status in northern and southern Thai patients. **Oral Dis.**; v. 10, p.138-144, 2004.

LEINEGGER, C.L.; LOCKHART, S.R.; VARGAS, K.; SOLL, D.R. Frequency, intensity, species, and strains of oral *Candida* vary as a function of host age. **J Clin Microbiol**, v.34, n.9, p. 2246-2254, 1996.

LIU, X.; LIU, H.; GUO, Z.; LUAN, W. Association of asymptomatic oral *Candidal* carriage, oral candidiasis and CD4⁺ lymphocyte count in HIV-positive patients in China. **Oral Dis.**; v. 12, p. 41-44, 2006.

MACHADO, F.C. Avaliação da Clorexidina para controle de gengivite e *Candida* spp. em crianças infectadas pelo HIV. Orientador: Ivete Pomarico Ribeiro de Souza, Gloria Fernanda de Araujo Castro. Rio de Janeiro: UFRJ, 2007. **Dissertação (Mestrado em Odontopediatria)**

MAKIHIRA, S.; NIKAWA, H.; TAMAGAMI, M.; HAMADA, T.; SAMARANAYAKE, L.P. Differences in *Candida albicans* adhesion to intact and denatured type I collagen in vitro. **Oral Microbiol Immunol.**; 17: p. 129–31, 2002.

MAKIHIRA, S.; NIKAWA, H.; TAMAGAMI, M.; HAMADA, T. Bacterial and *Candidal* adhesion to intact and denatured collagen in vitro. **Mycoses.**; 45: 389–92; 2001.

MARCHANT, S.; BRASILSFORD, S.R.; TWOMWY, A.C.; ROBERTS, G.J.; BEIGHTON, D. The predominant microflora of nursing caries lesions. **Caries Res.**; Basel, v.35, n.6, p. 397-406, 2001.

MIZIARA, I. D.; FILHO, B.C.A.; WEBER, R. Oral lesions in Brazilian HIV-infected undergoing HAART. **Pediatric Otorhinaryngoco.**; v. 70, p. 1089-1096, 2006.

MOALIC, E.; GESTALIN, A.; QUINIO, D.; GEST, P.E.; ZERILLI, A.; LE FLOHIC, A.M. The extent of oral fungal flora in 353 students and possible relationships with dental caries. **Caries Res.**; V.35; p.149-155, 2001.

MONDIN, M.E.B.G. Incidência de *Candida* spp. em crianças com cárie de mamadeira, antes e após o tratamento dental. 2003. 131f. **Tese (Mestrado em Biologia Buco-Dental)** – Faculdade de Odontologia, Universidade de Campinas, Piracicaba.

MORAES, A.P. Avaliação da Clorexidina para controle de gengivite e *Candida* spp. em crianças infectadas pelo HIV. Orientador: Ivete Pomarico Ribeiro de Souza, Orlando Chevitarese. Rio de Janeiro: UFRJ, 1998. **Dissertação (Mestrado em Odontopediatria)**

NAGLIK, J.R.; CHALLACOMBE, S.J.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteases in virulence and pathogenesis. **Microbiol Mol Biol Ver.**; v. 67; p. 400-428, 2003.

NAIDOO, S.; CHIKTE, U. Oro-facial manifestations in pediatric HIV: a comparative study of institutionalized and hospital outpatients. **Oral Dis.**; v. 10, p. 13-18, 2004.

NICOLATOU-GALITIS, O.; VELEGRAKI, A.; PAIKOS, S. *et al.* Effect of PI-HAART on the prevalence of oral lesions in HIV-I infected patients. A Greek study. **Oral Dis.**; v. 10, p. p. 145-150, 2004.

NIKAWA, H.; YAMAMOTO, T.; HAYASHI, S.; NIKAWA, Y.; HAMADA, T. Growth and/or acid production of *Candida albicans* on soft lining materials in vitro. **J Oral Rehabil.**; 21: p. 585–94, 1994.

NIKAWA, H.; EGUSA, H.; MAKIHIRA, S.; YAMASHIRO, H.; FUKUSHIMA, H.; JIN, C.; NISHIMURA, M.; PUDJI, R.R.; HAMADA, T. Alteration of the coadherence of *Candida albicans* with oral bacteria by dietary sugars. **Oral Microbiol Immunol.**; 16: p. 279–283, 2001.

NIKAWA, H.; HAMADA, T.; YAMASHIRO, H.; MURATA, H.; SUBIWAHJUDI, A. The effect of saliva or serum on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* colonization of hydroxylapatite beads. **J Dent.**; 26: p. 31–37, 1998.

NIKAWA, H.; HAYASHI, S.; NIKAWA, Y.; HAMADA, T.; SAMARANAYAKE, L.P. Interactions between denture lining materials, protein pellicles and *Candida albicans*. **Arch Oral Biol.**; 38: p. 631–4, 1993.

NIKAWA, H.; NISHIMURA, H.; YAMAMOTO, T.; HAMADA, T.; SAMARANAYAKE, L. P. The role of salivary or serum pellicle in the colonization process of *Candida albicans* on denture acrylic in vitro. **Microbial Ecol Health Dis.**; 9: p. 35-48, 1996.

NIKAWA, H.; SADAMORI, S.; HAMADA, T.; OKUDA, K. Factors involved in the adherence of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* to protein-adsorbed surfaces. An in vitro study using immobilized protein. **Mycopathologia.**; 118; p. 139-45, 1992.

NIKAWA, H.; SADAMORI, S.; HAMADA, T.; SATOU, N.; OKUDA, K. Non-specific adherence of *Candida* species to surface modified glass. **J Med Vet Mycol.**; 27: p. 269–71, 1989.

NIKAWA, H.; YAMASHIRO, H.; MAKIHIRA, S. *et al.* *In vitro* cariogenic potential of *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 46, p. 471-478, 2003.

NISHIMURA, M.; NIKAWA, H.; YAMASHIRO, H.; HAMADA, T. Embery G Cell-associated collagen activity by *Candida albicans*. **Mycopathologia.**; 153: p. 125-8; 2002.

ODDEN, K.; SCHENCK, K.; HURLEN, B. High numbers of T cells in gingiva from patients wit human immunodeficiency virus (HIV) infection. **J Oral Pathol Med.**; v.24, p. 413-19,1995

ODDS, F.C.; BERNAERTS, R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. **J Clin Microbiol.**; v. 32, n. 8; p. 1923-1929, 1994.

PATTERSON, M.K.J. Measurement of growth and viability of cells in culture. In: **Meth Enzymol.**; New York, Academic Press, 1979.

PATTON, L.L.; MACKAIG, R.; STRAUSS, R. *et al.* Changing prevalence of oral manifestations of human immunodeficiency virus in the era or protease inhibitor therapy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**; V. 89, n.3, p. 299-304, 2000.

POMARICO, L.; PORTELA, M.B.; ROJAS, G.C.A.; SOUZA, I.P.R.; SOARES, R.M.A.; CASTRO, G.F. Cariogenic and erosive potential of the medication used by HIV-infected children: pH and sugar concentration. **Community Dental Health.**; v. 25, p. 170-172, 2008.

PONGSIRIWET, S.; IAMAROON, A.; SRIBUREE, P. *et al.* Oral colonization of *Candida* species in perinatally HIV-infected children in Northen Thailand. **J Oral Science.**; v. 46, n. 2, p. 101-105, 2004.

PORTELA, M.B.; SOUZA, I.P.R.; COSTA, E.M.B. *et al.* Differential recovery of *Candida* species from subgingival sites in Human Immunodeficiency Virus-Positive and healthy children from Rio de Janeiro, Brazil. **J Clin Microbiol.**; v. 42, n. 12, p. 5925-5927, 2004.

PORTELA, M.B.; RIBEIRO, A.A.; CASTRO, G.F. *et al.* Oral health profile of HIV-infected children from Rio de Janeiro - Brazil. **J Dent Res.**; v, 79, Special Issue, p. 480 (abstract 2693), 2000.

RADFORD, J.R.; BALLANTYNE, H.M.; NUGENT, Z.; BEIGHTON, D.; ROBERTSON, M.; LONGBOTTOM, C.; PITTS, N.B. Caries-associated microorganisms in infants from different socio-economic backgrounds in Scotland. **J Dent.**, 28(5), p. 307-312, 2000.

RAMOS-GOMEZ, F.J. *et al.* Classification, diagnostic criteria, and treatment recommendations for orofacial manifestations in HIV-infected children. **J Clin Pediatr Dent.**; v. 23, n. 2, p. 85-96, 1999.

REGO, M.A.; KOGA-ITO, C.Y.; JORGE, A.O.C. Effects of oral environment stabilization procedures on counts of *Candida ssp.* in children. **Pesqui Odontol Brás.**; v.17, n. 4, p.322-6, 2003.

RIBEIRO, A. A.; PORTELA, M.; SOUZA, I.P. Relação entre biofilme, atividade de cárie e gengivite em crianças HIV+. **Pesqui Odontol Brás.**; 2002; 16: p. 144-50.

RIBEIRO, A.A.; BUNDZMAN, E.R.; NISHIO, C.; SOUZA, I.P.R. Relation between salivary flow, medicines and caries in HIV+ children. (Abstract 1676). **J Dental Res.**; v.77. (IADR abstracts), p. 841, 1998.

RIBEIRO, A.; THYLSTRUP, A.; SOUZA, I.P. VIANNA, R. Biofilme e atividade de cárie sua correlação em crianças HIV positivas (Abstract) In: **16 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica**. São Paulo, 1999.

RIBEIRO, A.A. Avaliação de um programa de promoção de saúde bucal em crianças HIV+. 2000. 186 p. **Dissertação (Mestrado em Odontologia)** - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

RICHARDSON, M.D. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. **J. Antimicrob. Chemo.**, v. 56, suplemento S1, p. i5-i11, 2005.

RUIZ-EXTREMERA *et al.* Follow up of transmission of hepatitis C to babies of human immunodeficiency virus-negative women the role of breast – feeding in transmission. **Ped Infect Dis J.**; v.19, p. 511-516, 2000.

RUSSELL, C.; LAY, K.M. Natural of *Candida* species and yeasts in the oral civilities of infants. **Arch Oral Biol.**; Oxford, v.18, n. 8, p. 95, 1973.

SAMARANAYAKE, L.P.; GEDDES, D.A.M.; WEETMAN, D.A.; MAC-FARLANE, T.W. Growth and acid production of *Candida albicans* in carbohydrate supplemented media. **Microbios.**; 37: p. 105–15, 1983.

SAMARANAYAKE, L. P.; HUGHES, A.; WEETMAN, D.; A, MACFARLANE, T. W. Growth and acid production of *Candida* species in human saliva supplemented with glucose. **J Oral Pathol.**; 15: p. 251–4, 1986.

SAMARANAYAKE, L.P.; SAMARANAYAKE, Y.H.; THEIN, Z.M. Characteristics of dual species *Candida* biofilms on denture acrylic surfaces. **Archs Oral Biol.**; p. 1200-1208; 2007.

SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, C. & PÉRES-MARTIN, J. Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis* – similar inputs, different outputs. **Curr Opin Microbiol.**; v. 4, p. 214-21, 2001.

SANTOS, L.C.; CASTRO, G.F.; SOUZA, I.P.; OLIVEIRA, R.H.S. Oral manifestations related to immunosuppression degree in HIV-positive children. **Braz Dent J.**; v. 12, n. 2, p. 135-138, 2001.

SEN, B.H.; SAFAVI, K.E.; SPANGBERG, L.S.W. Colonization of *Candida albicans* on cleaned human dental hard tissues. **Archs Oral Biol.**; v. 42, p. 513-520, 1997.

SILVA, R.A.; LOPES, F.F.; BARRETO, A.M. Estudo clínico das manifestações orais da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida Pediátrica. **RGO.**; v. 50, n. 1, p. 7-11, Jan./Fev./Mar., 2002.

SOARES, L.F.; CASTRO, G.F.B.A.; SOUZA, I.P.R.; PINHEIRO, M. Pediatric HIV-related oral manifestations – a five-year retrospective study. **Braz Oral Res.**; v.18, n. 1, p. 6-11, 2004.

SOUZA, I.P.R.; TELES, G.S.; CASTRO, G.F.; PRIMO, L.G.; VIANNA, R.B.C.; PERES, M. Prevalência de cárie em crianças infectadas pelo HIV. **Revista Brasileira de Odontologia**.; V. 53, n.1, 49-51, Jan/Fev, 1996.

STARR, J.R.; WHITE, T.C.; LEROUX, B.G. *et al.* Persistence of oral *Candida albicans* carriage in healthy Portuguese schoolchildren followed for 3 years. **Oral Microbiol Immunol.**; v. 17, p. 304-310, 2002.

SULLIVAN, D.; WESTWERNENG, T. J.; HAYNES, K. A. *et al.* *Candida dubliniensis* sp. Phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidiasis in HIV-infected individuals. **Microbiology**.; v. 141, pt. 7, p. 1507-21, Jul., 1995.

SULLIVAN, D.; COLEMAN, D.A. *et al.* *Candida dubliniensis*: as an emerging pathogen. **Curr Top Med Nycol.**; Nova York, vol.8, n.1-2, p. 507-21, 1998.

SWEET, S.P. Selection and pathogenicity of *Candida albicans* in HIV infection. **Oral Dis.**; v. 3 suppl. I, p. S88-S95, 1997.

SZIEGOLEIT, F.; SZIEGOLEIT, A.; WETZEL, W.E. Effect of dentário treatment and/or local application of amphotericin B to carious teeth on oral colonization by *Candida*. **Med Mycol.**; v. 37, n. 5, p. 345-350, 1999.

TEN CATE, JACOB, M.; TSUTOMU, TAKATSUKA & ROB, A.; EXTERKATE, M. Effects of Isomalt on enamel de- and remineralization, a combined in vitro pH-cycling model and in situ study. **Clin Oral Invest.**; 12: p. 173–177; 2008.

YANG, Y.L.; LO, H.J.; HUNG, CHEIN-CHING. Effect of prolonged HAART on oral colonization with *Candida* and candidiasis. **BMC Inf Dis.**; v. 6, n. 8, p. 1-4, 2006.

ZEPELIN, M.B.; MEYER, I.; THOMSEN, R. *et al.* HIV-protease inhibitors reduce cell adherence of *Candida albicans* strains by inhibition of yeast secreted aspartic proteases. **J Invest Dermatol.**; v. 113, n. 5, p. 747-751, Nov., 1999.

ANEXOS

ANEXO 1

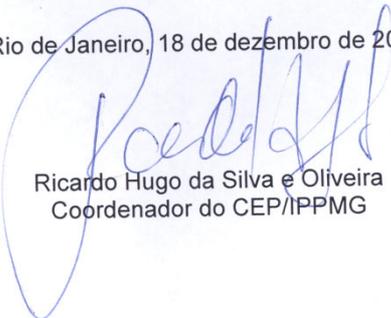
**UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO** UFRJ

**INSTITUTO DE PUERICULTURA E PEDIATRIA MARTAGÃO GESTEIRA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

MEMORANDO DE APROVAÇÃO

O projeto "Prevalência de *Cândida* spp. isoladas em biofilme dentário e sua associação com a doença cárie em crianças infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV)", de número 33/07-CEP/IPPMG, de responsabilidade da Dra. Senda Charone, foi analisado por este Comitê e aprovado nesta data.

Rio de Janeiro, 18 de dezembro de 2007



Ricardo Hugo da Silva e Oliveira
Coordenador do CEP/IPPMG

ANEXO 2



**FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ODONTOPEDIATRIA
MESTRADO EM ODONTOPEDIATRIA**

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

**PREVALÊNCIA DE *Candida* spp. ISOLADAS DE BIOFILME DENTAL E SUA ASSOCIAÇÃO
COM A DOENÇA CÁRIE EM CRIANÇAS INFECTADAS PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA
HUMANA (HIV)**

Prezado responsável,

A Disciplina de Odontopediatria da UFRJ e o Projeto SIDA/AIDS do IPPMG estão estudando os tipos de micróbios que habitam a boca das crianças infectadas pelo HIV em tratamento no ambulatório da DIP - Imuno do IPPMG. Para isso, será necessário colher um pouco de biofilme da criança, para ser estudada num laboratório e será feito um exame clínico da cavidade bucal. A criança também receberá escovação supervisionada e aplicação de flúor. Caso ela necessite de tratamento odontológico restaurador, ela receberá a(s) obturações necessárias no próprio projeto, e havendo necessidade de extrações ela será encaminhada para a Clínica de Odontopediatria – FO/UFRJ. O estudo está de acordo com o estabelecido na Resolução do CNS 196/96 e suas complementares e com o Código de Ética Médica de 1988. A participação é voluntária e em casos de desistência, a criança não sofrerá prejuízos em relação ao atendimento odontológico. As informações sobre cada criança retiradas de suas fichas médicas são confidenciais e sigilosas, sendo que a identidade de cada participante só será utilizada por membros da equipe da pesquisa.

É importante lembrar que os procedimentos realizados pelos próprios dentistas para coletar o biofilme não causarão, de maneira alguma, dano à criança.

O responsável pelo paciente poderá solicitar sua saída do estudo em qualquer momento, assim como a própria criança, e neste caso, os responsáveis pelo projeto se comprometem a não utilizar as informações obtidas.

Em caso de dúvidas ou necessidades, o responsável poderá entrar em contato com: Dra. Senda Charone, na Faculdade de Odontologia da UFRJ (Departamento de Odontopediatria e Ortodontia), ou pelos telefones (21) 2562-2101 / (21) 2562-2098/ (21) 81259499.

Atenciosamente,

Assinatura do Pesquisador Responsável

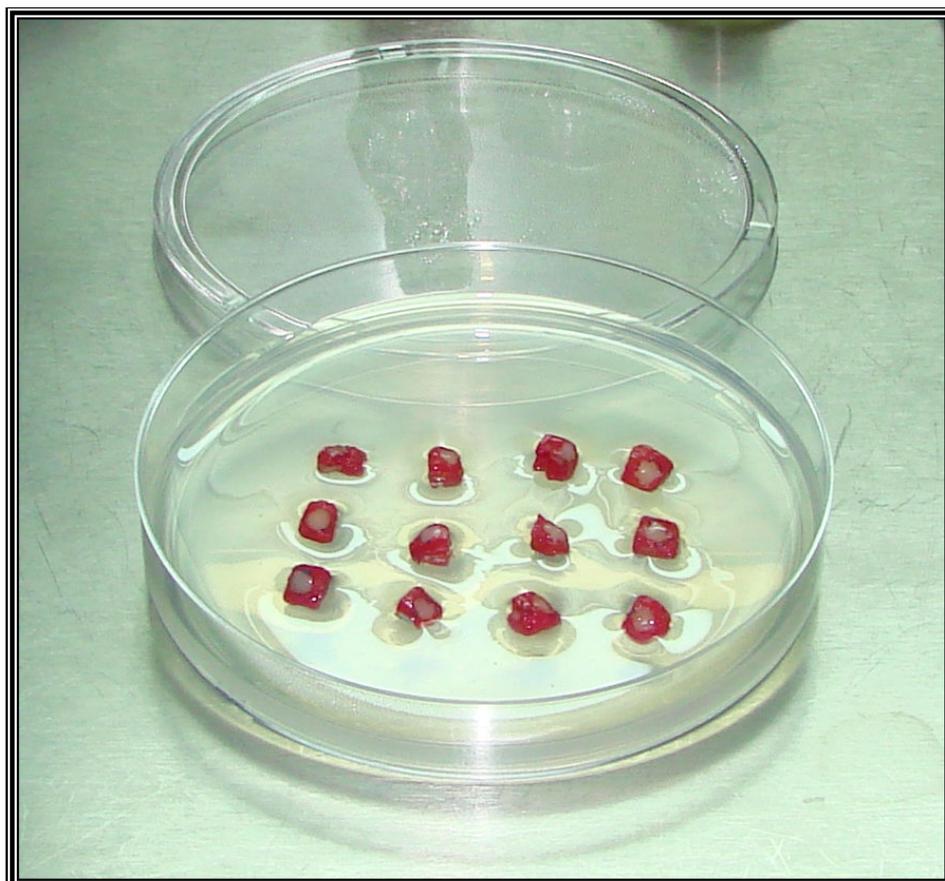
Eu, _____ identidade nº _____
responsável pelo menor _____, concordo com o
que foi exposto acima e autorizo sua participação na pesquisa.

Rio de Janeiro, ____ de _____ de _____.

Assinatura do Responsável

ANEXO 3

Figura 1: Placas *Petri* com YCB + 1% de BSA Agar, contendo 12 blocos dentais com a superfície do esmalte voltada para cima.



ANEXO 4

FICHA CLÍNICA N° _____ Data do Exame: _____
IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____
 Prontuário (IPPMG): _____
 DN: ___ / ___ / ___ sexo: ___ cor: ___ naturalidade: _____
 Mãe: _____ HIV (+) (-)
 Pai: _____ HIV (+) (-)
 End. _____
 Telefone: _____
 Responsável: _____
 Parentesco: _____
 Profissão do Responsável: _____

1) HISTÓRIA CLÍNICA

Classificação Clínica: _____
 Tipo de transmissão: (V) (T) (S) (D) (?)
Se transmissão vertical:
 Diagnóstico da infecção materna ocorreu em relação à gestação:
 () antes () durante () após
 Programa da Assistência à Gestante HIV+: (S) (N)
 Local: _____
 Usou AZT na gestação? (S) (N) (I)
 Aleitamento materno: (S) (N) (NS) duração: _____ meses
 Idade em que foi identificado como soropositivo: _____
 Instituição: _____
 Classificação no diagnóstico: _____
 Idade em que iniciou o acompanhamento no IPPMG: _____
 Data: _____
 Médico do IPPMG responsável: _____

Manifestação inicial da infecção pelo HIV:
 () febre () adenomegalias () hepatomegalia () esplenomegalia
 () diarreia crônica () PCP () infecção bacteriana de repetição
 () ↑parótida () anemia () leucopenia
 () plaquetopenia () atraso no desenvolvimento
 () emagrecimento () outros _____

Doenças definidoras de AIDS ou outras marcantes:
 () Encefalopatia pelo HIV () Retinite por CMV () Retinite por toxo
 () Neurotoxo () LIP () Micobacteriose () Tuberculose
 () PCP () DPC () Infecção bacteriana grave recorrente
 () Plaquetopenia () Esofagite () Miocardiopatia
 () Herpes Zoster
 Outras: _____

Faz uso de antiretroviral: () S () N

Qual?

() AZT () 3TC () ddI () Abacavir
 () Efavirenz () Delavirdina () Nevirapina () Saquinavir
 () Indinavir () Ritonavir () Nelfinavir () Amprenavir

Posologia: _____

Ouros: _____

Tempo: _____

2) EXAME ORAL

História prévia de manifestação oral: () S () N

Qual: _____

Tecidos Moles:

Extra-Oral:

Linfonodos submandibulares: () D () E () Não

Linfonodos cervicais: () D () E () Não

Linfonodos submentonianos: () S () N

Hipertrofia de Parótidas: () D () E () Não

Intra-Oral:Candidíase Pseudomembranosa: () S () N

local: _____

Candidíase Eritematosa: () S () N

local: _____

Eritema Linear Gengival: () S () N

local: _____

Queilite angular: () S () N

Gengivite: () S () N

dentes: _____

Retração gengival: () S () N

dentes: _____

Abscesso gengival: () S () N

dentes: _____

Fístula: () S () N

dentes: _____

Periodontite: () S () N

Estomatite herpética: () S () N

Herpes labial: () S () N

Leucoplasia Pilosa: () S () N

Sarcoma de Kaposi: () S () N

Úlcera aftosa: () S () N

Outros: _____

Exame dentário
CPOD / ceo e CPOS / ceos:

CPOD: _____ ceo: _____
CPOS: _____ ceos: _____

Nº. de lesões cavitadas ativas em dentina: _____

Dente	dist	vest	Mês	ling	oclus	Dente	dist	vest	mes	ling	oclus
1						1					
2						2					
3						3					
4						4					
5						5					
16						26					
17						27					
18						28					
Dente	dist	vest	Mês	ling	oclus	Dente	dist	vest	mes	ling	oclus
1						1					
2						2					
3						3					
4						4					
5						5					
46						36					
47						37					
48						38					

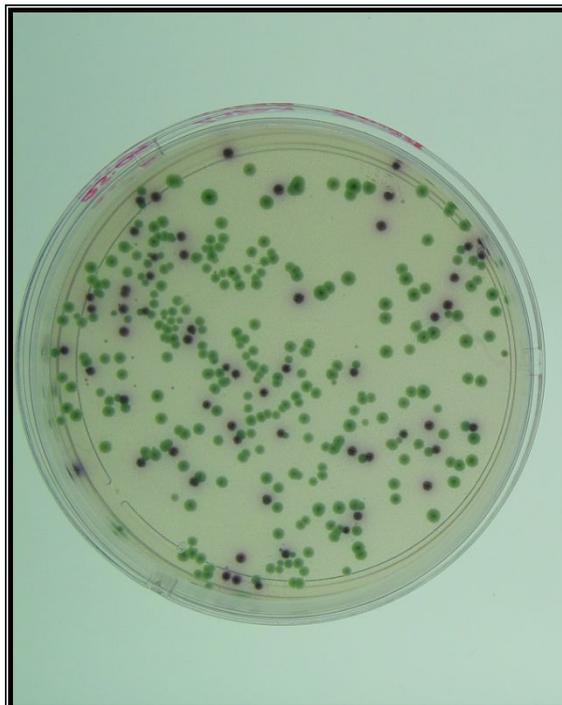
- 0 - sadia
- 1 - cárie ativa em esmalte, sem cavitação
- 2 - cárie inativa em esmalte
- 3 - cavitação ativa em esmalte
- 4 - cavitação inativa em esmalte
- 5 - cavitação ativa em esmalte / dentina
- 6 - cavitação inativa em esmalte / dentina
- 7 - dente com possível comprometimento pulpar
- 8 - restaurado
- 9 - extraído
- 10- exodontia indicada

3) EXAMES LABORATORIAIS

Data (__/ __/ __)	
CD4	
CD8	
T4/T8	
Plaquetas	

ANEXO 5

Figura 2: Contagem das Unidades Formadoras de Colônia (ufc) reveladas pelo meio CHROMagar *Candida*[®].



ANEXO 6



AVALIAÇÃO DA AMOSTRA

NOME: _____

FICHA Nº: _____

Nº. DO PRONTUÁRIO (IPPMG): _____

Índice de biofilme dental (escore: _____)

NÚMERO DE UFC:

Leitura	Total ufc	Classificação	Cor/ufc	Cor/ufc	Cor/ufc	Candida spp.
48 horas						
72 horas						

HOSSAIN *et al.* (2003): 0 = ausente; 1 = muito escasso (<10 colônias); 2 = escasso (10-10² colônias); 3 = moderado (10²-10³ colônias); 4 = numeroso (> 10³ colônias).

LEGENDA:

Cor presente	Candida spp.
Verde	<i>Candida albicans</i>
Azul arroxeado	<i>Candida tropicalis</i>
Rosa pálido	<i>Candida krusei</i>
Rosa escuro	<i>Candida glabrata</i>
Bege	<i>Candida parapsilosis</i>
Verde escuro	<i>Candida dubliniensis</i>

ANEXO 7**FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ODONTOPEDIATRIA
MESTRADO EM ODONTOPEDIATRIA****TERMO DE DOAÇÃO DENTES DECÍDUOS**

Eu _____
natural de _____, sexo _____ cor _____
residente à _____, telefone _____
portador do RG _____ (pai/mãe ou responsável)
_____, pelo menor
_____, aceito doar o (s) dente (s) para a presente
pesquisa, ciente de que o (s) mesmo (s) será (ão) utilizado (s) pela pesquisadora desta Faculdade
para estudo e treinamento pré-clínico. Estou consciente de que este (s) dente (s) foi (foram)
extraído (s) por indicação terapêutica para a melhoria da minha saúde, como documentado em
meu prontuário. Caso este (s) dente (s) seja (m) utilizado (s) em pesquisa, esta deverá ter sido
previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FO/UFRJ, sendo preservada minha
identidade na divulgação.

Rio de Janeiro, ____ de _____ de 20__

Assinatura do responsável

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)