

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**

**Centro de Ciência da Saúde**

**Faculdade de Odontologia**

**IMUNOGLOBULINAS SALIVARES E SUA RELAÇÃO COM  
*CANDIDA* spp. EM PACIENTES INFECTADOS PELO HIV**

Luciana Pomarico Ribeiro

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**

**Luciana Pomarico Ribeiro**

**IMUNOGLOBULINAS SALIVARES E SUA RELAÇÃO COM *CANDIDA* spp.**

**EM PACIENTES INFECTADOS PELO HIV**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Área de Concentração: Odontopediatria) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia (Área de Concentração: Odontopediatria).

Orientadores:

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Gloria Fernanda Barbosa de Araújo Castro**

Prof. Adjunta do Departamento de Odontopediatria e Ortodontia

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Ivete Pomarico Ribeiro de Souza**

Prof. Titular do Departamento de Odontopediatria e Ortodontia

**Rio de Janeiro**

**2009**

Ribeiro, Luciana Pomarico

Imunoglobulinas salivares e sua relação com *Candida* spp. em pacientes infectados pelo HIV / Luciana Pomarico Ribeiro. -- Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de odontologia, 2009.

98 f. : il. ; 31 cm.

Orientadores: Glória Fernanda Barbosa de Araújo Castro e Ivete Pomarico Ribeiro de Souza

Tese (doutorado) – UFRJ / Faculdade de odontologia / Pós-graduação em odontologia, 2009.

Referências bibliográficas: f. 83-91

1. Imunoglobulina A secretora. 2. Candidíase bucal. 3. Anticorpos. 4. HIV. 5. Odontopediatria – Tese I. Castro, Glória Fernanda Barbosa de Araújo. II. Souza, Ivete Pomarico Ribeiro. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de odontologia, Pós-graduação em odontologia. IV. Título.

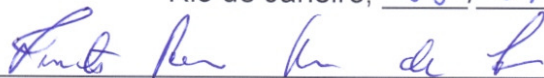
## FOLHA DE APROVAÇÃO

LUCIANA POMARICO RIBEIRO

### “IMUNOGLOBULINAS SALIVARES E SUA RELAÇÃO COM CANDIDA SPP EM PACIENTES INFECTADOS PELO HIV”

Dissertação de Doutorado 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 Doutor em Odontologia(Odontopediatria).

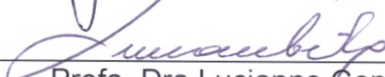
Rio de Janeiro, 08 / 07 / 2009.



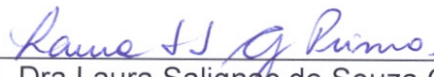
Prof. Dra Ivete Pomarico Ribeiro de Souza  
DO-Prof. Titular do Dept<sup>o</sup> de Odontopediatria e Ortodontia-FO-UFRJ



Prof. Dra Glória Fernanda Barbosa de Araújo Castro  
DO-Prof. Adjunta do Dept<sup>o</sup> de Odontopediatria e Ortodontia-FO-UFRJ



Prof. Dra Lucianne Cople Maia de Faria  
DO-Prof. Adjunta do Dept<sup>o</sup> de Odontopediatria e Ortodontia-FO-UFRJ



Prof. Dra Laura Salignac de Souza Guimarães Primo  
DO-Prof. Adjunta do Dept<sup>o</sup> de Odontopediatria e Ortodontia-FO-UFRJ



Prof. Dra. Lea Assed Bezerra da Silva  
DO-Prof. Titular do Dept<sup>o</sup> de Odontopediatria-FO-USP



Prof. Dra. Apoena de Aguiar Ribeiro  
DO-Prof. Adjunta do Dept<sup>o</sup> de Odontopediatria-FO-UFF



Prof. Dr. Rogério Gleiser  
DO-Prof. Adjunto do Dept<sup>o</sup> de Odontopediatria e Ortodontia-FO-UFRJ



## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Nivaldo e Ivete, que sempre estiveram ao meu lado, incentivando e apoiando todas as minhas decisões. Devo tudo que sou a vocês.

Amo muito vocês e obrigada por tudo!

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Ao meu marido Paulo, pelo companheirismo, compreensão e incentivo, principalmente nesta reta final do trabalho. Obrigada também por me ouvir inúmeras vezes e me dar conselhos nos momentos mais difíceis. Obrigada e te amo.

À minha irmã Claudia, que do seu jeito, é uma grande amiga e companheira, e que sempre esteve por perto em todos os momentos da minha vida. Tenho certeza que torce por mim.



## **AGRADECIMENTOS**

À Prof<sup>a</sup>. Ivete Pomarico Ribeiro de Souza, minha mãe, exemplo de dedicação, ética e competência em sua profissão. Estas qualidades me serviram de inspiração. Mais uma vez, obrigada por tudo.

À Prof<sup>a</sup>. Gloria Fernanda Castro, pela sugestão do tema, orientação e disposição em me ajudar neste trabalho. Obrigada também pelas muitas palavras de incentivo em todos esses anos de convivência.

Ao Prof. Ricardo Teles, pela co-orientação neste trabalho, pelos ensinamentos na parte laboratorial e pela atenção dedicada durante minha permanência no Forsyth Institute.

Aos Professores Sigmund Socransky e Anne Haffajee, pela gentileza e carinho com que me receberam no Laboratório de Periodontia do Forsyth Institute.

Aos professores do Departamento de Odontopediatria e Ortodontia da Universidade Federal do Rio de Janeiro: Gloria Fernanda Castro, Ivete Pomarico Ribeiro de Souza, Laura Primo, Lucianne Cople Maia, Marcelo Costa e Rogério Gleiser, pelos ensinamentos e oportunidades oferecidas durante os cursos de especialização, mestrado e doutorado.

À Prof<sup>a</sup>. Lucianne Cople Maia, pelo incentivo constante e palavras de apoio, nos momentos fáceis e difíceis de minha carreira. Obrigada pela confiança depositada e as oportunidades oferecidas.

À Prof<sup>a</sup>. Laura Primo, mais uma vez presente em minha banca de defesa, com a qual aprendi muito durante esses anos. Serei sempre grata pela confiança depositada.

Ao Prof. Rogério Gleiser, meu orientador do curso de especialização, pelos seus ensinamentos e disponibilidade, estando sempre pronto a me ajudar.

Aos professores Bárbara, Eduardo, Fátima, João Farinhas, Nena, Rosana Leonel e Thomaz Chianca, pelo convívio e valiosos ensinamentos transmitidos ao longo dos anos que foram dedicados aos cursos do Departamento de Odontopediatria e Ortodontia.

Às amigas da primeiríssima turma de doutorado em Odontopediatria, Márcia e Roberta, pelo companheirismo e por todos os momentos de convívio ao longo do curso.

À amiga Roberta Barcelos, pela convivência durante a especialização, e colega de turma no curso de mestrado e doutorado. Que possamos continuar nossa convivência profissional por muitos anos.

Às colegas das demais turmas de doutorado (Ana Karla, Andreia, Carla, Viviane, Cristiane e Patrícia) pelo convívio durante os anos de curso.

A todos os colegas do mestrado (Adílís, Camila, Renata, Ticiano, Rafael, Tatiana, Marina) pela convivência harmoniosa durante o curso.

À amiga Camila, minha orientanda desde a especialização, sempre com disposição total para realizar os trabalhos e compreensão nos meus momentos de ausência.

Às minhas eternas amigas de mestrado Alice Kelly, Livia Soares e Patrícia Mendes, pela amizade, incentivo e apoio sempre que precisei.

Às minhas amigas Ana Lúcia e Martinha, que mesmo não entendendo muito de odontologia, me apoiaram durante o curso.

Aos coordenadores do curso de Odontologia da Universidade Veiga de Almeida, Profs. Luiz Claudio Campos e Maurício Santa Cecília, pela confiança em mim depositada e o apoio dado durante o curso.

Às colegas de equipe da disciplina de Odontopediatria da Universidade Veiga de Almeida, Andrea e Lúcia, pelo apoio e por saberem entender meus momentos de ausência desde o início do curso de doutorado. Um agradecimento especial à amiga Áurea Simone, pela parceria e incentivo.

Aos funcionários do Departamento de Odontopediatria e Ortodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Andreia, Ednaldo, Isabel, Gina, João Carlos, Kátia, Luiza, Mere, Robson, Rose e Zezé), pela atenção e dedicação, sempre estando dispostos a ajudar com boa vontade.

A todos os “pequenos pacientes” e a equipe do Ambulatório de AIDS Pediátrica do IPPMG, pela contribuição para a realização deste trabalho.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Se as coisas são inatingíveis...ora!  
Não é motivo para não querê-las...  
Que tristes os caminhos, se não fora  
a presença distante das estrelas”*

**Mário Quintana**

## RESUMO

RIBEIRO, Luciana Pomarico. **Imunoglobulinas salivares e sua relação com *Candida* spp. em pacientes infectados pelo HIV**, 2009. Tese (Doutorado em Odontologia, área de concentração em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

O presente estudo teve como objetivo avaliar os níveis de imunoglobulinas salivares (IgA-S) e sua relação com a presença de *Candida* spp., imunossupressão e uso do HAART em pacientes infectados pelo HIV. Para isto, foi feita uma revisão sistemática da literatura para determinação dos níveis de IgA-S em pacientes infectados pelo HIV. Além disso, uma pesquisa com crianças infectadas pelo HIV e seus irmãos não infectados também foi realizada, na qual foram determinados os níveis totais de anticorpos IgA-S total e IgA-S específica anti-*Candida* spp. na saliva destas crianças. Correlacionou-se estes resultados com as análises microbiológicas, utilização de medicação anti-retroviral e classificação imunológica. No primeiro estudo, foram efetuadas buscas nas bases de dados eletrônicas PubMed, Web of Science, Google Scholar, Cochrane e EMBASE, com a finalidade de encontrar pesquisas clínicas que atendiam os seguintes critérios de elegibilidade: participantes adultos infectados pelo HIV e adultos não infectados; testes de diagnóstico para a infecção pelo HIV em ambos os grupos (caso e controle); a mesma metodologia (teste ELISA) para determinar os níveis de imunoglobulinas (IgA); o mesmo teste de diagnóstico IgA aplicado em uma população similar. Foram encontrados cento e quarenta e quatro estudos, todos em pacientes adultos, e seis atenderam aos critérios iniciais de inclusão. Em uma segunda avaliação, quatro estudos foram excluídos. Foi observado que os indivíduos adultos infectados pelo HIV apresentaram níveis de IgA-S específica maior que os não infectados. No segundo estudo, foram selecionadas 105 crianças, entre 2 e 14 anos, infectadas (65) e sem a infecção (40) pelo HIV. Foi coletada saliva estimulada de todas as crianças, seguido de exame clínico da cavidade bucal e coleta de dados do prontuário sobre história médica, exames laboratoriais e uso de medicação. Foram realizadas análises microbiológicas (CHROMagar *Candida*® e sistema API 20C) e imunológicas (ELISA) para determinação dos níveis de imunoglobulinas salivares. Os testes Kruskal-Wallis, Qui-Quadrado e coeficiente de correlação Biserial, Phi e de Spearman foram usados para as comparações entre os grupos. Foi observado que as crianças infectadas pelo HIV apresentaram níveis significantes mais elevados de imunoglobulina total ( $p < 0,05$ ) e específica ( $p < 0,001$ ) para *Candida* spp. ao comparar com as crianças sem a infecção. Quando se correlacionou a dosagem de imunoglobulina total com o uso de medicação (AR e HAART), foram observados níveis mais baixos ( $p < 0,05$ ), assim como nas crianças com imunossupressão mais grave ( $p < 0,05$ ). Conclui-se que estas crianças mantiveram sua capacidade de resposta imunológica para as *Candida* spp., visto que a dosagem de IgA específica para este patógeno se encontrava mais elevada.

**DESCRITORES:** Odontopediatria; HIV; Candidíase Bucal; Anticorpos; Imunoglobulina A secretora.

## ABSTRACT

RIBEIRO, Luciana Pomarico. **Imunoglobulinas salivares e sua relação com *Candida* spp. em pacientes infectados pelo HIV.** Rio de Janeiro, 2009. Tese (Doutorado em Odontologia, área de concentração em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

The objective of this study was to assess the salivary immunoglobulin levels (S-IgA) and their relationship with the presence of *Candida* spp., immunosuppression and the use of HAART in HIV-infected patients. Initially, a systematic literature review was carried out to determine the S-IgA levels in patients infected by HIV. Also, a research into HIV-infected children and their non-infected siblings was performed. Levels of total S-IgA antibodies and *Candida*-specific S-IgA antibodies in the saliva of these children were determined and then correlated with microbiological analyses for use of antiretroviral medication and immunological classification. In the first part of this study, electronic databases such as PubMed, Web of Science, Google Scholar, Cochrane and EMBASE were reviewed in order to find clinical studies according to the following eligibility criteria: HIV-infected adults and non-infected adults; HIV diagnostic tests of both groups (experimental and control); the same methodology (ELISA test) to determine IgA levels; the same IgA diagnostic test for similar population. A total of 144 studies were found, all involving adult patients, but only six fulfilling the initial inclusion criteria. Four other studies were excluded in a second evaluation. HIV-infected adult individuals had specific S-IgA levels higher than those from the non-infected ones. In the second study, 105 children aged 2-14 years old were selected: 65 infected with HIV and 40 non-infected. Stimulated saliva was collected from all the children, followed by a clinical exam of the mouth and collection of data concerning medical records, laboratory exams and medication. Microbiologic (CHROMagar *Candida*@ and API System 20C) and immunologic (ELISA) analyses were made to determine the salivary immunoglobulin levels. The Kruskal-Wallis test, chi-square test, biserial correlation coefficient, Phi correlation coefficient and Spearman correlation coefficient were used for comparing the groups. HIV-infected children were found to have significantly higher levels of total ( $p < 0.05$ ) and specific ( $p < 0.001$ ) immunoglobulins for *Candida* spp. compared to non-infected children. Lower levels ( $p < 0.05$ ) were observed when the total immunoglobulin dose was correlated with the use of medication (AR and HAART), a finding also observed in the children with more severe immunosuppression ( $p < 0.05$ ). One can conclude, therefore, that these children were able to keep their immunological response to *Candida* spp. as the IgA dose for this pathogen was higher.

**KEY WORDS:** Pediatric Dentistry; HIV; Candidiasis, Oral; Antibodies; Immunoglobulin A, Secretory

## RESUMEN

RIBEIRO, Luciana Pomarico. **Imunoglobulinas salivares e sua relação com *Candida* spp. em pacientes infectados pelo HIV**, 2009. Tese (Doutorado em Odontologia, área de concentração em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar los niveles de inmunoglobulina salivares (IgA-S) y su relación con la presencia de *Candida* spp., inmunosupresión y uso de HAART en pacientes infectados por VIH. Con éste objetivo fue realizada una revisión sistemática de la literatura para la determinación de los niveles de IgA-S en pacientes infectados por VIH. También fue realizada una investigación con niños infectados por VIH y sus hermanos, no infectados, donde fueran determinados los niveles totales de anticuerpos IgA-S total e Ig-S específica anti-*Candida* spp. en la saliva de éstos niños. Fueron correlacionados estos resultados con los análisis microbiológicos, utilización de medicamentos antirretrovirales y su clasificación inmunológica. En el primer estudio se efectuaron búsquedas en base a datos electrónicos PubMed, Web of Science, Google Acholar, Cochrane y Embase, con el fin de encontrar aquellas investigaciones clínicas que satisfagan los siguientes criterios de elegibilidad: participantes adultos infectados por VIH y adultos no infectados; test diagnósticos para la infección por VIH en ambos grupos (caso y control); la misma metodología (Test ELISA) para determinar los niveles de inmunoglobulinas (IgA); el mismo test diagnóstico (IgA) aplicado en una población similar. Se encontraron ciento y cuarenta y cuatro estudios, todos en pacientes adultos, siendo que seis atendieron los criterios iniciales y de inclusión. En una segunda evaluación, fueron excluidos cuatro estudios. Se observó que los individuos adultos infectados por VIH presentaron niveles específicos de IgA-S mayor que aquellos no infectados. En un segundo estudio fueron seleccionadas 105 niños, entre 2 y 14 años, infectados (65) y sin infección (40) por VIH. Fue colectada saliva estimulada de todos los niños, seguida de examen clínico de la cavidad bucal y colecta de datos del prontuario sobre la historia médica-historia clínica-, exámenes de laboratorio y uso de medicación. Fueron realizados análisis microbiológicos (CHROMagar *Candida*<sup>®</sup> y sistema API 20C) e inmunológicas (ELISA) para la determinación de los niveles de inmunoglobulinas salivares. Los testes Kruskal-Wallis, Chi-cuadrado y el coeficiente de correlación Biserial, Phi y de Spearman, fueron usados para las comparaciones entre los grupos. Se observó que los niños infectados por VIH mostraron niveles significantes más elevados de inmunoglobulina total ( $p < 0,05$ ) y específica ( $p < 0,001$ ) para *Candida* spp. comparados con los niños sin infección. Cuando fue correlacionada la dosis de inmunoglobulina total con el uso de la medicación (AR y HAART) los niveles observados fueron menores ( $p < 0,05$ ), así como los niños con inmunosupresión más grave ( $p < 0,05$ ). Se concluyó que éstos niños mantuvieron su capacidad de respuesta inmunológica para *Candida* spp., ya que la dosis de IgA específica para éste patógeno se encontraba más elevada.

**DESCRITORES:** Odontología Pediátrica; VIH; Candidiasis Bucal; Anticuerpos; Inmunoglobulina A secretora.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

4.1 **ARTIGO 1** ..... 30

Figure 1: Diagram of electronic literature search and selection process ..... 36

## LISTA DE TABELAS

4.1	<b><u>ARTIGO 1</u></b> .....	30
	Table 1: Abstracts search results from databases .....	33
	Table 2: Quality assessment of the selected studies according the risk of bias .....	37
	Table 3: Detailed descriptions of the ultimately selected studies .....	38
4.2	<b><u>ARTIGO 2</u></b> .....	45
	Table I: Characteristics of 40 HIV-negative (HIV-) and 65 HIV-positive (HIV+) children .....	54
	Table II: Characteristics of HIV-positive children by AIDS status .....	57
	Table III: Significant correlations among clinical, microbiological and immunological variables in HIV-positive children .....	58
	Table IV: Characteristics of HIV-positive children by AR and HAART use .....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AIDS -	AIDS negative
AIDS +	AIDS positive
AR	anti-retroviral
AR -	antiretroviral non-users
AR +	antiretroviral users
ATCC	American Type Culture Collection
<i>C.</i>	<i>Candida</i>
<i>Candida</i> spp.	espécies de <i>Candida</i>
<i>Candida</i> spp.	<i>Candida</i> species
CD4	células CD4
CD4	CD4 cells
CD8	células CD8
CD8	CD8 cells
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CFU	Colony forming unit
ELISA	ensaio de imunoadsorção ligado a enzima
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMBASE	Excerpta Medica Database
EU	ELISA units
HAART	Terapia anti-retroviral altamente ativa
HAART	Highly Active Antiretroviral Therapy

HAART +	HAART users
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HIV	Human Immunodeficiency Vírus
HIV -	HIV negative
HIV +	HIV positive
HRP	Horseshoe peroxidase
IgA	Imunoglobulina A
IgA	Immunoglobulin A
IgA1	Immunoglobulin A type 1
IgA2	Immunoglobulin A type 2
IgA-S	Imunoglobulina A secretora
IPPMG	Instituto de Pediatria e Puericultura Martagão Gesteira
g	gram
LGE	linear gingival erythema
min	minutes
ml	millilitre
n	número
n	number
N	Normal
NaOH	Sodium hydroxide
nm	nanometer
nNRTI	non-Nucleoside reverse transcriptase inhibitors
NRTI	Nucleoside reverse transcriptase inhibitors
NS	non-significant
OC	oral candidiasis

PBS	phosphate-buffered saline
PIs	Protease inhibitors
Pubmed	Publicações médicas
Pubmed	Medical publications
rpm	rotation per minutes
SD	standard deviation
S-IgA	Secretory immunoglobulin A
SAPs	secreted aspartic proteinases
vs.	versus
µg	microgram
µl	microlitres
°C	degree Celcius

## LISTA DE SÍMBOLOS

<	menor
%	porcentagem
®	marca registrada
=	igual
±	mais ou menos

## ÍNDICE

<b>1</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>Proposição .....</b>	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>Delineamento da Pesquisa .....</b>	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>Desenvolvimento da Pesquisa .....</b>	<b>29</b>
	4.1 ARTIGO 1 .....	30
	4.2 ARTIGO 2 .....	45
<b>5</b>	<b>Discussão .....</b>	<b>71</b>
<b>6</b>	<b>Considerações Finais .....</b>	<b>79</b>
<b>7</b>	<b>Conclusões .....</b>	<b>81</b>
	Referências .....	83
	Anexos .....	92

## 1 INTRODUÇÃO

O número de indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) é estimado em 33,2 milhões em todo o mundo e, deste total, 2,5 milhões são crianças com idade inferior a 15 anos (UNAIDS, WHO, 2007). Embora não tenha cura, a AIDS pode ser considerada atualmente uma doença crônica, graças aos avanços no seu tratamento.

Dentre os diversos esquemas terapêuticos prescritos para estes pacientes, com resultados promissores, cita-se a terapia anti-retroviral (MANN & TARANTOLA, 1998). Destaca-se também a terapia anti-retroviral altamente ativa (HAART), introduzida em meados da década de 1990. Esta terapia atua na progressão e supressão da carga viral destes pacientes (JORDAN et al., 2002; RUTHERFORD et al., 2003) e é composta pela combinação de pelo menos três drogas anti-retrovirais. Recomenda-se a combinação de duas drogas da classe de inibidores da transcriptase reversa análogo de nucleosídeo com uma droga da classe de inibidores da transcriptase reversa não-análogo de nucleosídeo e inibidores de protease (OLIVEIRA & ABREU, 2008). Foi observado que alguns pacientes submetidos a este regime terapêutico apresentaram grande melhora no seu sistema imune (OLANIYI & SUNDAY, 2005; PATTON et al., 2000; SOARES et al., 2004). No entanto, desenvolveram outras doenças associadas à infecção, caracterizando um quadro conhecido



como síndrome da reconstituição imune (GAITAN CEPEDA et al., 2008; LAWN & WILKONSON, 2006).

Uma das principais características da infecção pelo HIV é a frequência e persistência de infecções secundárias oportunistas na superfície mucosa (COOGAN et al., 1994; RAMOS-GOMEZ et al., 2000). É de fundamental importância o controle e a prevenção destas infecções (BARASCH et al., 2000), diagnosticando-as precocemente e instituindo a terapia adequada (RAMOS-GOMEZ et al., 2000).

Quanto às manifestações bucais, destaca-se a candidíase bucal (BARASCH et al., 2000; FONSECA et al., 2000; GRANDO et al., 2002; GRIMOUD et al., 1998; OLANIYI & SUNDAY, 2005; RAMOS-GOMEZ et al., 1999; RAMOS-GOMEZ et al., 2000; SANTOS et al., 2001), que pode estar relacionada com a presença e progressão da infecção e o estágio de AIDS (BARASCH et al., 2000; GRIMOUD et al., 1998; VASELIU et al., 2005). A prevalência da candidíase bucal chega a variar de 11% (VASELIU et al., 2005) a 45% (OLANIYI & SUNDAY, 2005) e pode ser observada diminuição em sua prevalência com a introdução do HAART (HODGSON et al., 2006; YANG et al., 2006).

As espécies de *Candida* são microorganismos comensais do trato gastrointestinal do ser humano, podendo ser encontradas em aproximadamente 44,4% de indivíduos saudáveis (ARENDORF & WALKER, 1980). A transição destes microorganismos para um estado de maior patogenicidade está diretamente relacionada com a diminuição da resistência do hospedeiro, mudanças na microbiota e mudanças na virulência intrínseca do microrganismo (SAMARANAYAKE, 1990). Numerosas espécies de candida

podem ser encontradas, tais como a *C. albicans*, *C. kruseii*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* (SULLIVAN et al., 1995). Entretanto, a primeira delas, um microrganismo oportunista que coloniza normalmente a mucosa bucal do ser humano, é o principal fungo isolado da cavidade bucal (FETTER et al., 1993; LYON et al., 2006; SÁNCHEZ-VARGAS et al., 2005; STARR et al., 2002; TORSSANDER et al., 1987; UGUN-CAN et al., 2007; WRAY et al., 1990). A *C. albicans* é também o fungo mais comumente encontrado em pacientes portadores da infecção pelo HIV (CERQUEIRA et al., 2007; COOGAN et al., 1994; COSTA et al., 2006; ODDEN et al., 1994; POLLOCK et al., 1992; SÁNCHEZ-VARGAS et al., 2005; SCHMIDT-WESTHAUSEN et al., 2004; TEANPAISAN & NITTAYANANTA, 1998; TORSSANDER et al., 1987), sendo também a espécie mais patogênica (COLEMAN et al., 1998).

As espécies do gênero *Candida*, principalmente a *Candida albicans*, que fazem parte da microbiota bucal de indivíduos sadios, podem desencadear imunidade específica (anticorpos), não acarretando, desta forma, as lesões sintomáticas. Por outro lado, em pacientes imunodeprimidos, seja pela infecção pelo HIV ou por efeito de terapia imunossupressora, este microrganismo muda seu estado de comensal para patógeno oportunista, resultando na infecção sintomática (ARENDORF & WALKER, 1980; SAMARANAYAKE, 1990). Segundo PUGLIESE et al. (2000) a aderência às células do hospedeiro representa um dos fatores de maior virulência da *Candida albicans*. Observa-se também a capacidade de produzir e secretar proteases aspárticas, aumentando assim seu poder de adesão, penetração e colonização dos tecidos (CASSONE et al., 1999). Além disso, destaca-se uma maior prevalência de espécies de *Candida*, observada em pacientes infectados pelo HIV,

independente de apresentarem lesões de candidíase bucal (COOGAN et al., 1994). TORSSANDER et al. (1987) reforçam este aspecto ao afirmar que a infecção pelo HIV pode influenciar na composição da microbiota destes pacientes. Este fato sugere que o mecanismo de defesa da mucosa bucal desses pacientes pode estar comprometido.

A resposta imunológica, função dos linfócitos, é definida como uma reação do organismo à exposição pelos antígenos. As imunoglobulinas são anticorpos e têm como principais funções: a) neutralizar toxinas microbianas e enzimas; b) impedir a aderência microbiana e a invasão dos tecidos; c) eliminar os microorganismos que abrigam os antígenos que causaram sua produção. Além disso, as imunoglobulinas se constituem em importantes fatores de proteção contra doenças infecciosas, tanto que sua ausência total ou parcial pode resultar em infecções crônicas ou fatais (WHITE, 1991). Estas imunoglobulinas estão presentes no sangue (imunoglobulinas séricas), e na saliva são denominadas imunoglobulinas salivares.

A saliva desempenha um papel importante na manutenção da integridade da cavidade bucal, seja protegendo-a contra infecções causadas por patógenos, como a *C. albicans*, seja atuando como agente de limpeza, ou através de seus componentes protéicos antifúngicos como as imunoglobulinas A secretoras (IgA-S) (LIN et al., 2001). Estas estão diretamente relacionadas com o mecanismo de defesa da mucosa bucal destes pacientes (ATKINSON et al., 1990), promovendo proteção através da inibição da aderência e penetração de microorganismos no tecido da mucosa (SVANBORG-EDÉN & SVENNERHOLM, 1978), inclusive da *Candida albicans* (VUDHICHAMNONG et al., 1982).

No entanto, a natureza da ação destes anticorpos específicos ainda não está totalmente elucidada. Acredita-se que uma diminuição na produção de IgA-S pode favorecer a colonização de *C. albicans* e desenvolvimento da candidíase bucal (COOGAN et al., 1994), como foi observado em um grupo de adultos com infecção pelo HIV e manifestação clínica de candidíase. Este grupo apresentou níveis mais baixos de IgA-S específica para *C. albicans*, quando comparado ao grupo sem lesão (WRAY, 1990). No entanto, os resultados encontrados na literatura são controversos, pois embora estudos com pacientes adultos infectados pelo HIV indiquem diminuição ou ausência de alteração nos níveis de IgA-S anti-*C. albicans* (BELAZI et al., 2002; WOZNIAK et al., 2002), outras pesquisas, também com indivíduos infectados pelo HIV, mostraram aumento destes anticorpos (COOGAN et al., 1994; DROBACHEFF et al., 2001; SWEET et al., 1995). Em um desses estudos, pacientes infectados pelo HIV, com candidíase bucal, apresentavam níveis mais elevados de IgA específica para *C. albicans* em relação aos indivíduos sem lesão (DROBACHEFF et al., 2001).

Além dos resultados controversos observados nos estudos já citados, é importante destacar a escassez de trabalhos que investigam respostas imunológicas sobre as infecções na cavidade bucal de pacientes infectados pelo HIV. Em se tratando de crianças infectadas pelo vírus, não há na literatura consultada pesquisas com este propósito. Considerando todos estes aspectos, justifica-se a realização de uma revisão sistemática sobre a atuação destes anticorpos em indivíduos infectados pelo HIV e uma investigação científica visando relacionar a presença destes anticorpos com as *Candida* spp. em crianças infectadas pelo HIV.

## 2 PROPOSIÇÃO

Relacionar os níveis de imunoglobulinas salivares com a presença de *Candida* spp. e imunossupressão em pacientes infectados pelo HIV.

2.1 Determinar, através de uma revisão sistemática da literatura, os níveis de imunoglobulinas salivares específicas (IgA-S) para *Candida albicans* em pacientes adultos infectados pelo HIV.

2.2 Comparar os níveis totais de anticorpos IgA-S total e IgA-S específicas anti-*Candida* spp. na saliva de crianças infectadas pelo HIV e em seus irmãos não infectados.

2.3 Correlacionar os níveis de anticorpos com *Candida* spp. isoladas, classificação imunológica da infecção pelo HIV e uso de medicação anti-retroviral (AR e HAART). Além disso, verificar a influência deste último sobre as lesões de candidíase bucal e níveis de anticorpos.

### 3 DELINEAMENTO DA PESQUISA

A presente pesquisa constituiu-se de dois estudos, sendo a seguir resumido o delineamento de ambos.

O primeiro estudo constou de uma revisão sistemática para verificar as evidências científicas sobre os níveis de anticorpos específicos para *Candida* spp. em indivíduos infectados pelo HIV. É importante destacar que, em se tratando de crianças, não foi encontrado nenhum trabalho na literatura consultada, razão pela qual o estudo foi realizado em populações de adultos. Foram efetuadas buscas nas bases de dados eletrônicas PubMed, Web of Science, Google Scholar, Cochrane e EMBASE. Foram selecionadas pesquisas clínicas controladas que atenderam aos seguintes critérios: (1) participantes adultos infectados pelo HIV e adultos não infectados; (2) testes de diagnóstico para a infecção pelo HIV em ambos os grupos (caso e controle); (3) a mesma metodologia (teste ELISA) para determinar os níveis de imunoglobulinas (IgA); (4) o mesmo teste de diagnóstico IgA aplicado em uma população similar.

O segundo estudo, do tipo seccional clínico e laboratorial, teve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IPPMG) (Anexo 1, página 75). Após a assinatura do Termo de Consentimento

Livre e Esclarecido pelos responsáveis (Anexo 2, página 76) e a anuência das crianças, foi iniciada a seleção dos pacientes desta pesquisa.

A seleção da amostra se deu pela forma de conveniência no Ambulatório de AIDS Pediátrica do IPPMG, durante um período de 08 meses, sendo a faixa etária dos pacientes entre 2 e 14 anos. De um universo de 200 pacientes em atendimento neste Serviço, e participantes do Projeto AIDS em Odontopediatria,\* foram selecionadas 65 crianças. A população estudada também foi constituída por irmãos destas crianças infectadas, com sorologia negativa para o vírus HIV. Este último grupo foi composto por 40 indivíduos.

Durante a coleta de informações, os dados pessoais e história médica foram obtidos através de consulta aos prontuários médicos e/ou junto aos responsáveis pelas crianças. Para os pacientes infectados pelo HIV, foram também pesquisados dados do prontuário referentes à classificação clínica e imunológica, diagnóstico definitivo para infecção pelo HIV, tipo de transmissão, uso de medicamentos anti-retrovirais (AR e HAART) e resultados recentes (até três meses) de exames laboratoriais (carga viral, relação CD4/CD8 e contagem de leucócitos). Em seguida, realizou-se a coleta de saliva e após, os pacientes receberam escovação supervisionada, aplicação tópica de flúor (Fluoreto de sódio 2,0%) e os responsáveis foram orientados sobre os cuidados com higiene bucal e dieta. Foi então realizado o exame clínico para verificação de lesões bucais, que foram registradas na ficha utilizada pelo Projeto AIDS em Odontopediatria (Anexo 3, página 72). Após a realização dos exames, todas as

---

\* A Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da UFRJ tem um convênio com o IPPMG e realiza, desde 1993, este projeto de atendimento preventivo e curativo às doenças cárie e periodontal junto às crianças matriculadas neste ambulatório do IPPMG.

crianças receberam tratamento odontológico conforme as suas necessidades.

Para concretizar os objetivos propostos para este segundo estudo, foi realizada a quantificação e identificação das *Candida* spp. da saliva através da utilização do CHROMagar *Candida*<sup>®</sup> e do sistema API 20C (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France), no Laboratório de Biologia de Protistas do Instituto de Microbiologia Geral Professor Paulo Góes (Departamento de Microbiologia Geral), da UFRJ. Após estas análises, foi feita a determinação dos níveis de imunoglobulinas totais e específicas para *C. albicans* através do teste ELISA no Laboratório de Periodontia do Forsyth Institute (Boston, EUA). Os resultados imunológicos foram correlacionados com os achados microbiológicos dos pacientes, sendo comparados os dois grupos estudados (infectados e não infectados pelo HIV). Foi feita também a correlação destes resultados com os dados relativos à utilização de medicação anti-retroviral, a terapia anti-retroviral altamente ativa e imunossupressão dos pacientes. Os testes Kruskal-Wallis, Qui-Quadrado e Coeficiente de correlação biserial, Phi e de Spearman foram usados para as comparações entre os grupos.



## **4 DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA**

### **4.1 ARTIGO 1**

“Levels of salivary IgA specific to *Candida* spp. in HIV-infected adult patients: a systematic review”.

### **4.2 ARTIGO 2**

“Associations among the use of highly active antiretroviral therapy, oral candidiasis, oral *Candida* species and salivary immunoglobulin A in HIV-infected children”. Artigo aceito. Periódico: Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics.

## 4.1 ARTIGO 1

**Levels of salivary IgA specific to *Candida* spp. in HIV-infected adult patients: a systematic review**

Short title: Salivary immunoglobulin levels in HIV infection

**Luciana Pomarico<sup>a</sup>, Ivete Pomarico Ribeiro de Souza<sup>a</sup>, Glória Fernanda Barbosa de Araújo Castro<sup>a</sup>, Ricardo Palmier Teles<sup>b</sup>, Ronir Raggio Luiz<sup>c</sup>, Lucianne Cople Maia<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Department of Paediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>b</sup>Department of Periodontology, The Forsyth Institute, Boston, MA, USA.

<sup>c</sup> Institute of Public Health Studies, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil.

**Abstract**

*Objective:* To perform a systematic review of published data with the aim of evaluating the levels of specific salivary immunoglobulins (IgA) to *Candida albicans* in HIV-infected adult patients. *Methods:* The search strategy was based on PubMed, Web of Science, Google Scholar, Cochrane and EMBASE databases. Also, the reference lists of included studies were searched. All abstracts found by electronic searches were independently scrutinized by two reviewers. To be eligible for review, the controlled clinical trials had to present the following characteristics: samples of both HIV-infected adults and noninfected adults; appropriate HIV-diagnostic tests for both patient groups (case and control); use of the same methodology (ELISA test) to obtain IgA diagnosis; IgA-diagnostic test applied to a similar population sample. *Results:* Of 144 studies found, only six met the initial eligibility criteria, but four were excluded after a thorough analysis. To assess the methodological quality of the two remaining studies, they were categorized according the risk of bias. Both selected studies revealed that the levels of *Candida albicans*-specific IgA antibody were higher in HIV-infected individuals compared with the control group. *Conclusion:* Adequate IgA antibody responses to *Candida albicans* appear to be maintained, since the levels of these antibodies were higher in all studies selected. Although the findings of this systematic review are encouraging, the scientific evidence should be interpreted carefully because there are only a few reports in the literature, mostly because of the lack of important methodological details or the varying methodologies employed.

**Keywords:** HIV; Antibodies; Immunoglobulin A, Secretory; Mouth mucosa; Oral candidiasis

## Introduction

The main sequelae of HIV infection are frequent persistent opportunistic infections of mucosal surfaces,<sup>1-3</sup> with oral candidiasis being the most common.<sup>2-6</sup> This suggests that the oral mucosal defense mechanisms of these patients has been compromised. Saliva contains a variety of proteins that play a key role in maintaining oral defences and protecting oral tissues.<sup>7</sup> One of these proteins is salivary secretory immunoglobulin A (S-IgA), which affords protection by inhibiting microorganisms' adhering to and penetrating mucosal tissues,<sup>8,9</sup> including *Candida albicans*,<sup>10,11</sup> an etiological agent of oral candidiasis.<sup>12</sup>

HIV-infected patients are generally colonized with *Candida* species (spp.),<sup>12</sup> *Candida albicans* being the most frequent species observed.<sup>12-14</sup> Therefore, a decreased level of S-IgA would permit colonization and development of oral candidiasis. However, the role of specific antibody in protecting mucosal surfaces has not been elucidated.<sup>1</sup>

Considering oral colonization of *Candida* spp. in HIV-infected patients and oral candidiasis as a significant clinical manifestation of this disease, there is great relevance of studies reporting the detection of fungi-specific IgA in these patients to achieve a more precise diagnosis of the patient's condition. Therefore, this systematic review evaluates the levels of specific salivary immunoglobulins against *Candida albicans* in HIV-infected adult patients.

## Materials and Methods

### *Study selection criteria*

The search strategy was based on PubMed, Web of Science, Google Scholar, Cochrane and EMBASE databases and only articles published before

October 2008 were considered for review. A hand search was performed and the reference lists of these articles were also used for obtaining additional relevant publications that could have been missed during database searches (Table 1). Databases were searched to include only papers and abstracts in English. Terms used in this literature search are presented in Table 1. In EMBASE, a senior librarian and specialist in health science database, helped us select the specific terms.

Table 1. Abstracts search results from databases

Database	Key Words	Abstracts Found	Abstracts Selected	Final Selection
PubMed		70	4	1
Web of Science	secretory IgA saliva HIV	9	0	0
Google Scholar	oral candida candida albicans	39	4	1
Cochrane	immunoglobulins antibody response	0	0	0
EMBASE	fungal virulence protein analysis protein determination protein function	26	6	2
Reference Lists	—	0	0	0

We determined that, in addition to the necessity of the study being a controlled clinical trial, the following requirements had to be met: (1) participants to be either HIV-infected adults and noninfected adults; (2) appropriate HIV-diagnostic tests for both patient groups (case and control) be made; (3) the same methodology (ELISA test) to obtain IgA diagnosis be used and; (4) the IgA-diagnostic test be applied to a similar population sample. In addition,

articles were excluded when: (1) the trials were not performed in an adult population, (2) there was no control group and (3) there were case reports.

All records electronically identified were scanned by title and abstract. Eligibility of the selected studies was determined by reading the abstract of the articles identified by each electronic database. Two authors independently assessed the methodological quality of the trials and the retrieved data. In cases of discrepancies, a decision was made by consensus. Full texts were obtained of all articles identified and judged as being potentially relevant. Then a new evaluation was made, this time for complete articles. A consensus was reached through discussion regarding which articles fulfilled the inclusion criteria, and these were finally included in the systematic review. If relevant data was missing, the authors of the articles in question were contacted for additional information.

#### *Quality assessment*

The methodological quality of the studies was assessed as regarding the risk of bias. To each selected study, we applied the following questions: Were the groups' ages matched? Was blinded analysis of data mentioned in the text? Were the data recorded in detail? Was the HIV group divided according to immunological classification?

Each reviewer classified the study as: A, low risk of bias, when the answer was Yes to at least three questions; B, moderate risk of bias, when the answer was Yes to two questions; C, high risk of bias, when the answer was Yes for only one question or none.

## Results

### *Study characteristics*

A total of 144 abstracts were initially identified in the electronic databases, but very few ( $n = 2$ ) fulfilled the inclusion criteria (Table 1). Comparing the results between databases, PubMed provided the greatest diversity of abstracts despite the omission of a series of abstracts selected elsewhere. EMBASE and Google Scholar provided 12 and 27 references not found in PubMed, respectively. Web of Science provided seven references not found in any of the other databases. Because most of abstracts were found in more than one database, the number of abstracts is large in relation to the final number of articles (Table 1).

After we had selected all the abstracts fulfilling the selection criteria and verified their eligibility by reading the complete articles, only six studies remained. Although, we initially considered only English, one study was written in Japanese. Because it was thought to be potentially relevant despite the unfamiliar idiom, the authors were asked for a translation. After a second reading, one study was excluded because its authors failed to perform an HIV test for the control group. This group selection was based on individuals identified as being at high- or low-risk for exposure to HIV.<sup>15</sup> At this time, we verified that these five studies failed to report the same inclusion criteria (appropriate HIV diagnostic test for both experimental and control groups), so we decided to contact the authors by e-mail. Although the author of one study<sup>16</sup> answered positively, the article was not included because of the different methodology used in detecting IgA. In that study, the authors had measured total and specific IgA by immunofluorometric assay.<sup>16</sup> Another study, written and

translated by Namikoshi et al.,<sup>17</sup> was rejected because only total IgA was assessed, and specific IgA to candida was not measured. Finally, another study<sup>21</sup> was rejected because we were unable to contact the author (Figure 1).

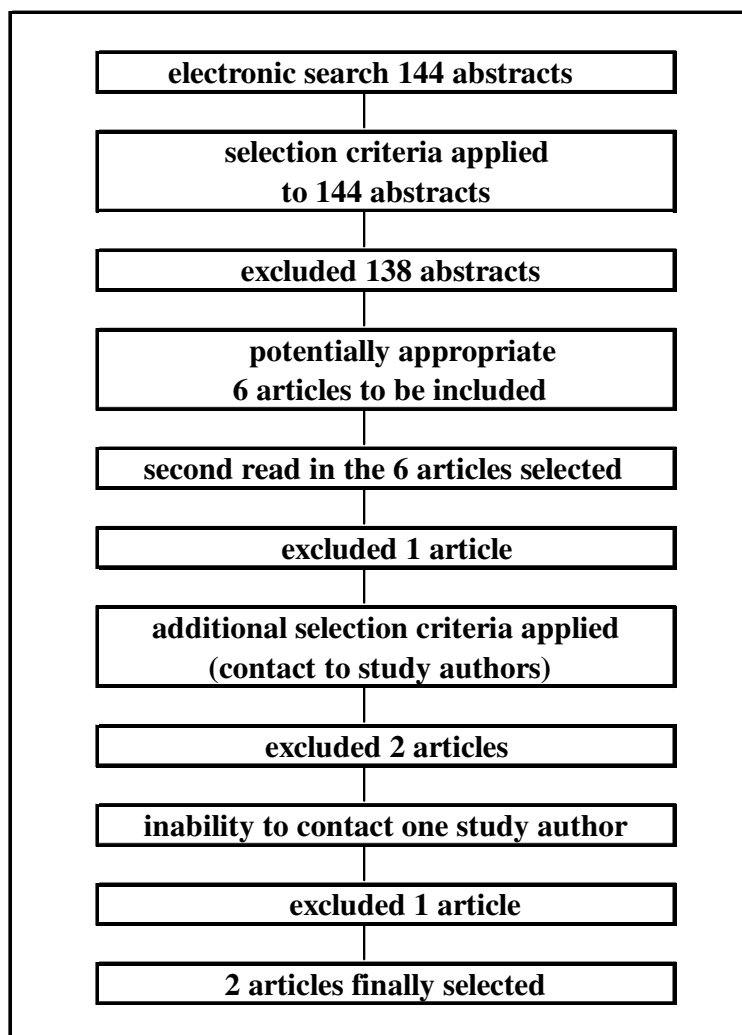


Figure 1. Diagram of electronic literature search and selection process.

### *Quality assessment*

Quality assessment of the final selected studies (n=2) showed that one of them<sup>1</sup> was categorized as low risk of bias, as it had three questions answered positively. The other study<sup>18</sup> was categorized as a moderate risk of bias,



answering two questions positively. Both studies answered negatively to blind analysis of data (Table 2).

Table 2. Quality assessment of the selected studies according the risk of bias

Authors	Groups age matched	Blinded analysis of data	Details of data collection	Immunological classification division	Classification
Coogan et al (1994)	Yes	No	Yes	Yes	A
Sweet et al (1995)	Yes	No	Yes	No	B

### *Data synthesis of the selected studies*

A summary of the characteristics of each study selected and detailed findings are available in Table 3. Coogan et al.<sup>1</sup> have observed a concentration of IgA to *Candida albicans* in a sample of 124 HIV-infected and noninfected adults between 19 and 73. Nonstimulated saliva was collected from the individual and yeast culture was prepared using Sabouraud's dextrose agar and an API 20 AUX system. Levels of IgA antibodies to *Candida albicans* were determined through enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Concentrations of IgA, IgA1 and IgA2 antibodies specific to *Candida albicans* were found to be greater in both HIV-infected and AIDS subjects than in control.

Sweet et al.<sup>18</sup> have analysed 126 HIV-infected and noninfected individuals aged 21 to 60. Whole nonstimulated saliva was collected and yeast-cultured in Sabouraud's agar. IgA, IgA1 and IgA2 concentrations were measured by solid-phase ELISA. Levels of IgA, IgA1 and IgA2 antibodies specific to *Candida* were determined using a similar ELISA method. According to the authors, the total IgA concentration in whole saliva is generally lower in

HIV-infected subjects compared with controls while, *Candida*-specific IgA antibody levels were significantly higher.

No meta-analysis could be undertaken because of the limited number of studies included.

Table 3. Detailed descriptions of the ultimately selected studies

Authors	Sample characteristics	Sample size (n)	Data collection methods	Test used	Results of HIV group
Coogan et al (1994)	HIV-infected and non infected adults	72 - HIV 52 - Control	unstimulated saliva	Sabouraud API 20 ELISA	high specific IgA to <i>Candida albicans</i>
Sweet et al (1995)	HIV-infected and non infected adults	74 - HIV 52 - Control	unstimulated saliva	Sabouraud ELISA	low total IgA; high specific IgA to <i>Candida albicans</i>

## Discussion

As can be seen, there are few studies in the literature regarding this theme. Because systematic reviews are based on extremely rigorous inclusion and exclusion criteria, the number of articles tends to decrease, especially when further criteria are imposed by the author as occurred in the present study. The objective of this work was to quantify the levels of specific salivary immunoglobulins to *Candida albicans* in HIV-infected adult patients using the ELISA test. As a result, some studies had to be excluded (e.g., Drobacheff et al.<sup>16</sup>) because of a different methodology for evaluating IgA levels. Similarly, another study was rejected because nonspecific antibodies had been evaluated despite the use of the ELISA test.<sup>17</sup> Two other studies were excluded for different reasons, as also commented.

Many studies have investigated the behaviour of the immune system of patients with immunosuppression, specifically, HIV-infected patients. However,

some authors have evaluated the total concentration of antibodies in the oral cavity of such individuals instead of antibodies specific to certain antigens, as occurred in the present study of *Candida albicans*. For example, Bard et al.<sup>19</sup> showed higher levels of total IgA in HIV-infected patients who had oral candidiasis. Similar results were found by Atkinson et al.<sup>20</sup> and Grimoud et al.,<sup>2</sup> who showed that infected patients had higher concentrations of secretory IgA compared with noninfected ones.

Despite the exclusion of some studies in our review base, we were able in relation to the total number of studies to identify sufficient patients to support the result found in the present review and to demonstrate evidence of high levels of antibodies specific to *Candida* spp. in HIV-infected patients. Studies such as that of Drobacheff et al.,<sup>16</sup> although excluded, have also shown high levels of antibodies in HIV-infected patients with candidiasis. Similar findings were reported in another study for a small percentage of HIV-positive patients and a larger group of controls, despite the lack of testing. High levels of IgA were observed in both groups.<sup>12</sup> On the other hand, Belazi et al.<sup>21</sup> found no difference in the IgA concentrations between infected and noninfected patients.

The degree of systemic compromise among these patients is another factor to be taken into account. Some researches<sup>1,18</sup> have suggested an increase in the specific antibody production in these patients. However, as infection worsens, IgA concentration tends to decrease in AIDS patients. Such a fact is corroborated by Castro et al.,<sup>22</sup> who observed that a group of more severely immunosuppressed patients had a low concentration of antibodies specific to cariogenic microorganisms. However, Wozniak et al.<sup>15</sup> found no difference in the IgA concentration between patients presenting different levels

of immunosuppression. Consequently, changes in IgA levels should be analyzed judiciously in individuals with some systemic problems, since these usually correlate with the degree of immunosuppression. These data are very helpful in obtaining a more precise diagnosis of the patient's risk of acquiring an opportunistic disease. Although IgA levels are an important salivary component involved in the oral mucosal defense mechanism, both preventive measures and observations of any antibody changes will provide better treatment of candidiasis.

## **Conclusions**

It can be concluded that adequate IgA antibody responses to *Candida albicans* appear to be maintained, since the levels of these antibodies were found to be higher in all studies selected. Although the findings found in this systematic review are quite strong, the scientific evidence should be interpreted carefully because there are only few reports in the literature, either lack important methodological details or use different methodologies.

## **References**

1. Coogan MM, Sweet SP, Challacombe SJ. Immunoglobulin A (IgA), IgA1, and IgA2 antibodies to *Candida albicans* in whole and parotid saliva in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *Infection and Immunity* 1994;**62**:892-96.

2. Grimoud AM, Arnaud C, Dellamonica P, Lodter JP. Salivary defence factor concentrations in relation to oral and general parameters in HIV positive patients. *European Journal of Oral Sciences* 1998;**106**:979-85.
  
3. Ramos-Gomez FJ, Petru A, Hilton JF, Canchola AJ, Wara D, Greenspan JS. Oral manifestations and dental status in paediatric HIV infection. *International Journal of Paediatric Dentistry* 2000;**10**:3-11.
  
4. Barasch A, Safford MM, Catalanotto FA, Fine DH, Katz RV. Oral soft tissue manifestation in HIV-positive vs. HIV-negative children from an inner city population: A two-year observational study. *Pediatric Dentistry* 2000;**22**:215-20.
  
5. Fonseca R, Cardoso AS, Pomarico I. Frequency of oral manifestations in children infected with human immunodeficiency virus. *Quintessence International* 2000;**31**:419-22.
  
6. Grandó LJ, Yurgel LS, Machado DC, Silva CL, Menezes M, Picolli C. Manifestações estomatológicas, contagem de linfócitos T-CD4+ e carga viral de crianças brasileiras e norte-americanas infectadas pelo HIV. *Pesquisa Odontológica Brasileira* 2002;**16**:18-25.
  
7. Mandel ID. The role of saliva in maintaining oral homeostasis. *Journal of the American Dental Association* 1989;**119**:298-304.

8. Fubara ES, Freter R. Protection against enteric bacterial infection by secretory IgA antibodies. *Journal of Immunology* 1973;**111**:395-403.
9. Svanborg-Eden C, Svennerholm AM. Secretory immunoglobulin A and G antibodies prevent adhesion of *Escherichia coli* to human urinary tract epithelial cells. *Infection and Immunity* 1978;**22**:790-97.
10. Epstein JB, Kimura LH, Menard TW, Truelove EL, Pearsall NN. Effects of specific antibodies on the interaction between the fungus *Candida albicans* and human oral mucosa. *Archives of Oral Biology* 1982;**17**:469-74.
11. Vudhichamnong K, Walker DM, Ryley HC. The effect of secretory immunoglobulin A on the *in-vitro* adherence of the yeast *Candida albicans* to human oral epithelial cells. *Archives of Oral Biology* 1982;**27**:617-21.
12. Wray D, Felix DH, Cumming CG. Alteration of humoral responses to *Candida* in HIV infection. *British Dental Journal* 1990;**168**:326-29.
13. Costa CR, de Lemos JA, Passos XS, Araújo CR, Cohen AJ, Souza LK and et al. Species distribution and antifungal susceptibility profile of oral candida isolates from HIV-infected patients in the antiretroviral therapy era. *Mycopathologia* 2006;**162**:45-50.
14. Sánchez-Vargas LO, Ortiz-López NG, Villar M, Moragues MD, Aguirre JM, Cashat-Cruz M and et al. Point prevalence, microbiology and antifungal

susceptibility patterns of oral *Candida* isolates colonizing or infecting Mexican HIV/AIDS patients and healthy persons. *Revista Iberoamericana de Micología* 2005;**22**:83-92.

15. Wozniak KL, Leigh JE, Hager S, Swoboda RK, Fidel Jr PL. A comprehensive study of *Candida*-specific antibodies in the saliva of human immunodeficiency virus-positive individuals with oropharyngeal candidiasis. *The Journal of Infectious Diseases* 2002;**185**:1269-76.

16. Drobacheff C, Millon L, Monod M, Piarroux R, Robinet E, Laurent R and et al. Increased serum and salivary immunoglobulins against *Candida albicans* in HIV-infected patients with oral candidiasis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2001;**39**:519-26.

17. Namikoshi S, Ohshima T, Chiba H, Maeda N. Relationship between oral *Candida* and salivary antimicrobial proteins in HIV-positive individuals. *Journal of Tokyo Medical University* 2004;**62**:625-34.

18. Sweet SP, Challacombe SJ, Naglik JR. Whole and parotid saliva IgA and IgA-subclass responses to *Candida albicans* in HIV infection. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1995;**371B**:1031-34.

19. Bard E, Laibe S, Clair S, Biichlé S, Millon L, Drobacheff C and et al. Nonspecific secretory immunity in HIV-infected patients with oral candidiasis. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 2002;**31**:276-84.

20. Atkinson JC, Yeh C, Oppenheim FG, Bermudez D, Baum BJ, Fox PC. Elevation of salivary antimicrobial proteins following HIV-1 infection. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 1990;**3**:41-8.

21. Belazi M, Fleva A, Drakoulakos D, Panayiotidou D. Salivary IgA and serum IgA and IgG antibodies to *Candida albicans* in HIV-infected subjects. *International Journal of STD & AIDS* 2002;**13**:373-7.

22. 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 Microbiology and Immunology* 2004;**19**:1-8.



## 4.2 ARTIGO 2

**Associations among the use of highly active antiretroviral therapy, oral candidiasis, oral *Candida* species and salivary immunoglobulin A in HIV-infected children**

Luciana Pomarico, DDS, MSD,<sup>a</sup> Daniella Ferraz Cerqueira, DDS, MSD,<sup>a</sup> Rosangela Maria de Araujo Soares, PhD<sup>b</sup> Ivete Pomarico Ribeiro de Souza, DDS, MSD, PhD,<sup>c</sup> Gloria Fernanda Barbosa de Araujo Castro, DDS, MSD, PhD,<sup>d</sup> Sigmund Socransky, DDS,<sup>e</sup> Anne Haffajee, BDS, DDPH,<sup>e</sup> and Ricardo Palmier Teles, DDS, DMSc<sup>f</sup>

<sup>a</sup> Postgraduate Student, Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

<sup>b</sup> Associate Professor, Institute of Microbiology Prof. Paulo de Góes, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

<sup>c</sup> Full Professor, Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

<sup>d</sup> Associate Professor, Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

<sup>e</sup> Senior Researcher, Department of Periodontology, The Forsyth Institute, Boston, MA, USA

<sup>f</sup> Associate Member of the Staff, Department of Periodontology, The Forsyth Institute, Boston, MA, USA

**Abstract**

**Objectives.** To examine the impact of antiretroviral therapy on the prevalence of oral candidiasis, recovery of oral *Candida* species (spp.) and salivary levels of total secretory immunoglobulin A (SIgA) and *Candida*-specific SIgA in human immunodeficiency virus (HIV)-infected children. **Methods.** Sixty six HIV-positive and 40 HIV-negative children were cross-sectionally examined for the presence of oral lesions. Whole stimulated saliva samples were collected for the identification of *Candida* spp. using culture and measurement of total and specific SIgA using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results.** HIV-positive children had a higher prevalence of oral candidiasis ( $p < 0.05$ ); higher frequency of detection of *Candida* spp. ( $p < 0.05$ ) and higher levels of total ( $p < 0.05$ ) and *Candida*-specific SIgA ( $p < 0.001$ ) than did HIV-negative children. Among HIV-positive subjects, antiretroviral users had lower viral loads ( $p < 0.001$ ), lower levels of *Candida* spp. ( $p < 0.05$ ) and total SIgA ( $p < 0.05$ ) compared with antiretroviral non-users. **Conclusions.** The use of antiretroviral therapy was associated with decreases in the prevalence of oral candidiasis. This diminished exposure to *Candida* spp. was accompanied by decreases in levels of total and *Candida*-specific SIgA.

**Key words:** HIV infection, child, HAART, *Candida*, secretory IgA

## Introduction

Oral candidiasis is the most common opportunistic infection in human immunodeficiency virus (HIV)-positive (HIV+) children and adults and it can cause a considerable level of morbidity.<sup>1,2</sup> It has been postulated that co-infection with HIV and *Candida* species (spp.) may influence the severity and rate of HIV disease progression in HIV+ individuals.<sup>3</sup> Prevalence and severity of oral candidiasis worsen with the progression of the HIV infection and its manifestation is associated with the development of acquired immune deficiency syndrome (AIDS).<sup>4-6</sup> Several species of *Candida* can colonize the oral cavity and result in candidiasis. Of those, *Candida albicans* is, by far, the most prevalent species in HIV-infected children and adults.<sup>7,8</sup> This yeast is also commonly found in healthy individuals from childhood but innate and adaptive salivary immune systems control its growth, averting infection.

Since the introduction of antiretroviral drugs, particularly the highly active antiretroviral therapy (HAART), the prevalence of oral candidiasis in HIV-infected adults<sup>9-11</sup> and children<sup>12-16</sup> has decreased dramatically. Two potential mechanisms account for this finding, the immune reconstitution induced by HAART and an antifungal effect.<sup>17</sup> HAART results in an increase in the levels of CD4+ T lymphocytes rescuing the immune system,<sup>18</sup> while the protease inhibitors present in the drug cocktail could interfere with secreted aspartic proteinases (Saps), the main proteases secreted by *C. albicans*, hampering its proliferation and pathogenicity.<sup>19</sup>

Due to the pivotal role of CD4+ T lymphocytes in the maturation of the oral secretory immune system, a failure in this immunity as a consequence of the HIV infection has been proposed.<sup>20</sup> Early reports have suggested a

decrease in the levels of *C. albicans*-specific secretory immunoglobulin A (SIgA) in the oral cavity of HIV-positive adults having oral candidiasis, compared with those without it.<sup>21</sup> However, other studies have reported an increase in the levels of anti-*C. albicans* SIgA in HIV-infected subjects compared with HIV-negative (HIV-) individuals.<sup>22-24</sup> Positive associations between increased levels of anti-*C. albicans* SIgA and the presence of oral candidiasis have also been described.<sup>23</sup> These findings suggest that the salivary secretory immune system maintains its responsiveness despite HIV infection. However, studies comparing the levels of salivary IgA in HIV-infected subjects with and without AIDS have indicated that in the more advanced stages of HIV-induced immunosuppression, the oral secretory immune system might become less effective.<sup>25,26</sup>

Although several studies have examined the presence of oral candidiasis in HIV-infected children and suggested a decrease in the prevalence of these lesions after the introduction of HAART, there are no studies in the literature examining, at the same time, correlations among of the use of antiretroviral therapy and HAART and the salivary levels of *Candida* spp. and SIgA. Therefore, the goal of the present study was to examine the impact of the use of antiretroviral therapy, particularly HAART, on the prevalence of oral candidiasis, recovery of *Candida* spp. from the oral cavity and salivary levels of total SIgA and *Candida*-specific SIgA in children infected with HIV. In addition, we explored associations among these clinical, microbiological and immunological parameters with the degree of immunosuppression of the study subjects.

## **Methods**

### ***Study population***

The subjects of this cross-sectional study consisted of 65 children infected with HIV by vertical transmission (HIV-positive group) and 40 HIV-seronegative children, who were siblings of HIV-positive children (HIV-negative group). Enrolled children were 2 to 14 years of age, and the groups were gender and age matched. All HIV-positive patients attended the Pediatric AIDS Outpatients Clinic at the Federal University of Rio de Janeiro, Brazil, and had definitive diagnosis for HIV infection confirmed by two positive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tests and one positive Western Blot. The seronegative status of the control group also was confirmed by ELISA and Western Blot. Exclusion criteria included systemic or local treatment with antifungals or antibiotics within the previous three months. The study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Rio de Janeiro, and informed consent forms were obtained from all the children's legal guardians.

### ***Sample collection and clinical examination***

Sample collection for microbiological and immunological analyses and the clinical examination were performed by two calibrated pediatric dentists. Subjects were instructed not to eat, drink or brush their teeth for a period of two hours prior to their sampling appointment. After chewing on a paraffin stick (1 gram), subjects expectorated whole stimulated saliva into sterile vials for five minutes until approximately 500  $\mu$ l of saliva had been collected. Suction bulbs (Sigma®, Brazil) were used whenever children were unable to expectorate.

Since the study population included very young children, salivary flow could not be determined reliably, as several children swallowed saliva during sample collection. All samples were refrigerated and transferred to a laboratory within two hours after collection. Saliva samples were cleared by centrifugation at 9,300 g for 10 min to pellet bacteria and the supernatant was kept at -80 °C until assayed. Following sample collection, all children were assessed for oral lesions. The following data were collected from the children's medical records: personal information, medical history and results from laboratory tests (the closest ones to the time of sample collection) including immunological and clinical classification (CDC classification<sup>27</sup>), percentage of CD4- and CD8-positive cells, CD4/CD8 ratio, viral load, diagnosis of AIDS, antiretroviral therapy, HAART and use of antifungal or other medication. Antiretroviral therapy involved the use of one or more nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI) with or without non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (nNRTI). Patients were considered to be using HAART whenever protease inhibitors (PIs) were added to their antiretroviral regimen.

### ***Microbiological analysis***

Each saliva sample was diluted 1:10 with 0.9% sterile saline solution (pH 7.2) without bacteriostatic agents. Aliquots of 100 µl were cultured on plates with a chromogenic agar (CHROMagar *Candida*®) and incubated at 37°C for 48-72 hours. The culture medium allows the presumptive identification of *Candida* spp. based on the color of each colony.<sup>28</sup> Colonies were counted on plates with positive growth to calculate the number of colony forming units (CFU) per ml of saliva. The positive growths were classified according to Lamey

et al.<sup>29</sup> as mild (< 10 CFU/mL), moderate (11-49 CFU/mL) or strong (> 50 CFU/mL) growth. Plates exhibiting no growth were incubated for another 24 hours to confirm the absence of *Candida* spp. colonies.

Green colonies were inoculated onto Sabouraud dextrose agar to screen for the ability to grow at 45°C, for 48 hours, to differentiate *C. albicans* and *C. dubliniensis*, since the latter fails to grow at 45°C.<sup>30</sup> In addition, each different colored colony was characterized by sugar substrate assimilation profiles using the API 20C system® (bioMérieux, France), which allows the phenotypical differentiation of clinical isolates according to their sugar assimilation and fermentation reactions. The sugars methyl- $\alpha$ D-glucopyranoside and D-xylose (API 20D system) were also tested to differentiate *C. albicans* and *C. dubliniensis*.

### ***Immunological analysis***

The salivary concentration of total SIgA was determined using a commercial indirect competitive ELISA kit (Salimetrics LLC, State College, PA), specifically designed for saliva samples. In brief, goat anti-human SIgA conjugated to horseradish peroxidase (HRP) was added to standards (ranging from 2.5 to 600  $\mu$ g/ml) and saliva samples (diluted 5-fold) and incubated at room temperature for 90 min. After incubation, standards and saliva samples were added to a microtitre plate coated with human SIgA and incubated at room temperature for 90 min on a rotator (400 rpm). After incubation and wash of unbound components, captured conjugate was measured by the addition of the substrate tetramethylbenzidine. Optical density was read at 450 nm on a plate reader (BIO-TEK Instruments. Inc., Winooski. VT). The results from the

standard curve were plotted using a semi-logarithmic scale, and a curve generated. The concentrations of total SIgA were determined by comparing the optical density data to a standard curve using a four parameter logistic-log model and the ELISA for Windows software (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA).

Specific SIgA for *C. albicans* was measured using a modified ELISA. Microplates (Costar) were coated with formalin-killed *C. albicans* (ATCC 10231) in PBS at  $3 \times 10^7$  cells/ml, and incubated for three hours at room temperature and transferred to a cold room. After at least two days of incubation at 4°C, the plates were washed and incubated with diluted saliva samples (1:5 in blocking buffer [0.1% bovine albumin in PBS-Tween]) overnight at 4°C. Captured SIgA was detected by incubation with monoclonal mouse anti human secretory component diluted in blocking buffer (1:1,000) (Sigma. St. Louis. MO). Bound primary antibody was detected by reaction with biotinylated goat anti-mouse IgG diluted in blocking buffer (1:20,000) (Sigma. St. Louis. MO) followed by incubation with streptavidin-HRP conjugate diluted in blocking buffer (1:500). Substrate (Substrate Reagent Pack, R&D Systems) was added to each well and after 30 minutes the reaction was stopped by the addition of 1N NaOH. Conversion of substrate was determined at 405 nm using an ELISA reader (BIO-TEK Instruments. Inc., Winooski. VT.). Salivary antibody concentrations were calculated by reference to a pool of standard saliva samples obtained from subjects with high levels of antibody activity, which was assigned the value of 1000 ELISA units (EU). The results were plotted on a semi-logarithmic scale, and a curve generated. The concentrations of *C. albicans*-specific SIgA were



determined using linear regression and the software Prism 5 for Windows (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

### **Data Analysis**

Significance of differences between HIV-negative and HIV-positive children and AIDS-negative (AIDS-) and AIDS-positive (AIDS+) children was determined using the Mann-Whitney test for the variables: age, yeast CFU/ml, total SIgA and *Candida*-specific SIgA. Significance of differences for the percentage of males, prevalence of the various oral lesions and percentage of subjects with *Candida* spp. carriage was tested using chi-square test. The Mann-Whitney test was also used to examine the significance of differences between AIDS-negative and AIDS-positive subjects regarding the percentage of CD4+ and CD8+ T cells, the CD4/CD8 ratio and their viral load. Relationships among clinical, microbiological and immunological variables were explored using the Phi correlation coefficient for correlations between dichotomous data; the Biserial correlation coefficient for correlations between dichotomous and quantitative data and the Spearman correlation coefficient for correlations between continuous data.

In order to examine the effects of antiretroviral therapy and HAART on the clinical, microbiological and immunological parameters, the HIV-positive subjects were separated into three groups: 1) antiretroviral non-users (AR-), 2) antiretroviral users (AR+) and 3) HAART users (HAART+). Groups were compared using the Kruskal-Wallis test and the chi-square test, depending on the nature of the variable.

## Results

### *Subject Population and Clinical Manifestations*

The study population was composed of 105 subjects, 65 HIV-positive children and 40 HIV-negative siblings of HIV-positive children varying in age from 2 to 14 years. The two groups had similar age and gender distribution (Table I). In HIV-negative children, gingivitis was the only oral lesion detected. Oral candidiasis and recurrent oral candidiasis were detected significantly more frequently in HIV-positive children. Other oral lesions also found in HIV-positive children were: cheilitis, linear gingival erythema (LGE), labial herpes and ulcers, but differences from HIV-negative children were too few in number to be significant. The prevalence of gingivitis was similar in the two groups (Table I).

Table I - Characteristics of 40 HIV-negative (HIV-) and 65 HIV-positive (HIV+) children

	HIV-	HIV+	p-value
n	40	65	
% males	45	42	NS*
Age (years)	8.1 ± 3.3	8.5 ± 2.7	NS**
<u>% of subjects with:</u>			
oral candidiasis (OC)	0	11	p < 0.05*
recurrent OC	0	35	p < 0.001*
cheilitis	0	5	NS*
linear gingival erythema	0	2	NS*
gingivitis	35	30	NS*
herpes simplex virus infection	0	6	NS*
ulcers	0	3	NS*
oral <i>Candida</i> carriage	57	80	p < 0.05*
<u>means ± SD</u>			
yeast CFU/mL	77.1 ± 230.4	68.5 ± 178.2	p < 0.05**
Total SIgA (µg/ml)	111.0 ± 59.1	141.0 ± 75.2	p < 0.05**
anti- <i>C. albicans</i> SIgA (EU)	16.6 ± 8.7	39.6 ± 67.5	p < 0.001**

\* Tested using the chi-square test

\*\* Tested using the Mann-Whitney test

Sixty three percent of the HIV-infected children had AIDS. Seventy six percent of the HIV-positive children were on antiretroviral therapy but only 36% were taking HAART. Table II presents the clinical and immunological data for the HIV-positive children divided into AIDS-negative (n = 24) and AIDS-positive (n = 41) subjects. AIDS-positive children had a significantly lower mean % of CD4+ cells and a lower mean CD4/CD8 ratio. There was no difference in the viral load ( $\times 10^4$ ) between AIDS-negative and AIDS-positive children. The prevalence of several oral lesions (i.e., oral candidiasis, recurrent oral candidiasis, gingivitis, herpes simplex virus infection) was higher in AIDS individuals than in AIDS-negative children but differences were not statistically significant. Cheilitis, linear gingival erythema (LGE) and ulcers were only identified in AIDS patients.

#### *Oral Candida spp. Isolation*

HIV-positive children presented a significantly higher percentage of subjects with positive growth of yeast than HIV-negative children (80% vs. 57%, respectively;  $p < 0.05$ ). However, HIV-negative subjects presented a significantly higher mean yeast concentration in saliva ( $77.1 \pm 230.4$  CFU/mL) than HIV-positive subjects ( $68.5 \pm 178.2$  CFU/mL). When the median was compared between the two groups, the results were  $2.0 \pm 230.4$  and  $18.5 \pm 178.2$  for HIV-negative and HIV-positive subjects, respectively. Of the *Candida* spp. identified, *C. albicans* was the most prevalent in HIV-negative children (74% [of the yeast positive subjects]), followed by *C. parapsilosis* (43%), *C. guilliermondii* (17%), *C. tropicalis* (17%), *C. krusei* (9%), *C. dubliniensis* (4%) and *C. glabrata* (4%). In HIV-positive subjects the frequencies of detection of

the different *Candida* spp. were: *C. albicans* (94%), *C. parapsilosis* (6%), *C. guilliermondii* (23%), *C. tropicalis* (17%), *C. krusei* (2%), *C. dubliniensis* (2%), *C. glabrata* (2%) and *C. lusitaniae* (8%). When the two groups were compared using the chi-square test, *C. albicans* was significantly more prevalent in HIV-positive than in HIV-negative children ( $p < 0.05$ ), while *C. parapsilosis* was significantly more prevalent in HIV-negative children compared to HIV-positive subjects ( $p < 0.001$ ).

#### *Total secretory IgA and SIgA specific for Candida*

HIV-positive children had significantly higher levels of total SIgA  $\mu\text{g/ml}$  ( $141.0 \pm 75.2$  [mean  $\pm$  SD]) than their HIV-negative siblings ( $111.0 \pm 59.1$ ) ( $p < 0.05$ ) (Table I). Levels of SIgA specific for *Candida* measured in ELISA units (EU) were also significantly elevated in the HIV-positive children ( $39.6 \pm 67.5$ ) compared to HIV-negative siblings ( $16.6 \pm 8.7$ ) (Table I). In the HIV-positive group, AIDS-positive subjects had significantly lower levels of total SIgA ( $126.7 \pm 69.0$ ) compared to AIDS-negative subjects ( $165.5 \pm 80.3$ ) ( $p < 0.05$ ), while the levels of anti-*Candida* SIgA were higher in AIDS-positive ( $44.3 \pm 83.4$ ) children compared to AIDS-negative children ( $31.5 \pm 21.3$ ), but differences were not statistically significant (Table II).

Table II - Characteristics of HIV-positive children by AIDS status

	AIDS-	AIDS+	p-value
n	24	41	
% AR users	11 (45.8%)	38 (92.7%)	p < 0.01*
% HAART users	3 (12.5%)	21 (51.2%)	p < 0.01*
%CD4+ cells	25	20	p < 0.01*
%CD8+ cells	48	51	NS**
CD4/CD8	0.55	0.50	p < 0.05**
viral load (x 10 <sup>4</sup> )	8.6 ± 14.5	7.6 ± 12.0	NS**
% of subjects with:			
oral candidiasis (OC)	4	14	NS*
recurrent OC	21	43	NS*
cheilitis	0	7	NS*
linear gingival erythema	0	2	NS*
gingivitis	21	36	NS*
herpes simplex virus infection	4	7	NS*
ulcers	0	5	NS*
oral <i>Candida</i> carriage	88	76	NS*
means ± SD			
yeast CFU/mL	46.9 ± 87.4	80.9 ± 213.6	NS**
Total SIgA (µg/ml)	165.5 ± 80.3	126.7 ± 69.0	p < 0.05**
anti- <i>C. albicans</i> SIgA (EU)	31.5 ± 21.3	44.3 ± 83.4	NS**

\* Tested using the chi-square test

\*\* Tested using the Mann-Whitney test

#### *Correlations among clinical, immunological and microbiological parameters*

A significant positive correlation was found between *Candida*-specific SIgA and yeast CFU/mL of saliva (Spearman  $r = 0.26$ ,  $p < 0.01$ ) as well as a significant correlation between total SIgA and *Candida*-specific SIgA (Spearman  $r = 0.27$ ,  $p < 0.05$ ), using data from all subjects. Within the HIV+ group, several significant negative associations were found among clinical parameters and immunological parameters including the diagnosis of AIDS, recurrent oral candidiasis and gingivitis with %CD4+ cells (Table III). The levels of total SIgA also had a significant negative association with the presence of AIDS. The use of antiretrovirals was inversely associated with the viral load, the detection of

yeast in saliva and the presence of oral candidiasis, while the use of HAART also had a negative correlation with the isolation of *Candida* spp. in saliva.

Table III - Significant correlations among clinical, microbiological and immunological variables in HIV-positive children

Variables		Correlation Coefficient	p-value
AIDS	%CD4+	-0.24*	p < 0.05
AIDS	Total SIgA	-0.25*	p < 0.05
gingivitis	%CD4+	-0.29*	p < 0.05
recurrent OC	%CD4+	-0.34*	p < 0.01
recurrent OC	oral candidiasis	-0.37**	p < 0.01
antiretroviral	viral load ( $\times 10^4$ )	-0.30*	p < 0.01
antiretroviral	oral candidosis	-0.26**	p < 0.05
antiretroviral	+ve growth	-0.28**	p < 0.05
HAART	+ve growth	-0.42**	p < 0.001

\*Biserial correlation coefficient

\*\*Phi correlation coefficient

#### *Effects of antiretroviral therapy and HAART on clinical, immunological and microbiological parameters*

All clinical, immunological and microbiological parameters were compared among antiretroviral non-users (AR-), antiretroviral users (AR+) and HAART users (HAART+) groups. The results reported in Table IV demonstrate that the prevalence of AIDS was significantly higher among HAART users, followed by patients on antiretroviral drugs and patients in the antiretroviral non-users group. Differences among groups were also significant for viral load, percentage of subjects with positive growth of *Candida* spp., yeast CFU/mL and total SIgA, with values for AR- > AR+ > HAART+ subjects. A similar trend was found for *Candida*-specific SIgA, but differences were not significant. The prevalence of oral candidiasis was highest in the non-medicated group, but

differences were not significant. Conversely, recurrent oral candidiasis was diagnosed more frequently in HAART users, followed by AR+ and AR- subjects.

Table IV - Characteristics of HIV-positive children by AR and HAART use

	AR-	AR+	HAART+	p-value
n	16	25	24	
% males	31	42	50	NS*
Age (years)	7.1 ± 3.1	8.9 ± 2.4	9.0 ± 2.6	NS**
% AIDS	19	69	88	p < 0.001*
%CD4+ cells	23	21	22	NS**
%CD8+ cells	49	49	51	NS**
CD4/CD8	0.48	0.50	0.57	NS**
viral load (x 10 <sup>4</sup> )	14.8 ± 18.6	7.1 ± 10.2	4.4 ± 9.0	p < 0.01**
% of subjects with:				
oral candidiasis (OC)	25	4	8	NS*
recurrent OC	25	31	46	NS*
oral <i>Candida</i> carriage	100	88	58	p < 0.01*
means ± SD				
yeast CFU/mL	115.1 ± 254.8	83.5 ± 196.9	21.29 ± 34.4	p < 0.05**
Total SIgA (µg/ml)	188.2 ± 87.2	130.6 ± 64.8	119.9 ± 65.4	p < 0.05**
anti- <i>C. albicans</i> SIgA (EU)	51.2 ± 74.7	42.0 ± 87.5	28.9 ± 22.5	NS**

\* Tested using the chi-square test

\*\* Tested using the Mann-Whitney test

## Discussion

Our data have confirmed the responsiveness of the SIgA system to candidal infections in HIV positive children even with clinical progression to AIDS. The high titers of *Candida*-specific SIgA in HIV-positive children resulted from a higher prevalence of oral candidiasis and colonization by *Candida* spp. Antiretroviral therapy and HAART were accompanied by immune reconstitution and a decrease in prevalence of oral candidiasis and *Candida* spp. carriage. The decrease in antigenic exposure resulted in a decrease in levels of *Candida*-specific SIgA. The addition of protease inhibitors to the antiretroviral regimen in HAART resulted in further decreases in oral candidiasis prevalence and candidal carriage, which might have resulted from the direct anti-yeast effects of

the protease inhibitors. To our knowledge, this is the first report to examine simultaneously the impact of antiretroviral therapy on the clinical manifestation of candidiasis and on microbiological and immunological parameters associated with this infection.

In accord with previous reports,<sup>12-15</sup> HIV-infected children had a higher prevalence of oral lesions, particularly current and recurrent oral candidiasis, compared with non-infected children. Within the HIV-infected group, when the most immunocompromised children with the diagnosis of AIDS were singled out, these subjects presented significantly higher prevalence of several oral lesions when compared with AIDS- individuals, including: oral candidiasis, recurrent oral candidiasis, gingivitis and labial herpes (Table II). A Biserial correlation coefficient of -0.34 between the percentage of CD4+ cells and the prevalence of recurrent oral candidiasis ( $p < 0.01$ ) confirmed the association between the level of immunosuppression, and the occurrence of oral candidiasis. Our data on the isolation of *Candida* spp. from the oral cavity of HIV-positive and HIV-negative children paralleled the clinical diagnosis of candidiasis. The prevalence of yeast carriage in the HIV-positive group was significantly higher than the HIV-negative group; however, the mean yeast CFU/mL of saliva was higher in the HIV-negative group. This finding could be explained by the highly skewed distribution of values in the HIV-negative children, with outlier values inflating the mean. In contrast, HIV-negative subjects had lower median yeast concentrations (2.0 vs. 18.5) CFU/mL than the HIV-positive subjects.

*C. albicans* was the most prevalent *Candida* spp. and it was more prevalent in HIV+ subjects compared to HIV- individuals, while *C. parapsilosis*



was significantly more frequently detected in HIV- children. In accordance with these findings, Contreras et al.<sup>31</sup> observed that *C. parapsilosis* was the most abundant species in the oral cavity of healthy children. However, over time, this *Candida* spp. was gradually replaced by *C. albicans*, possibly due to its greater pathogenic potential and antifungal resistance.

In the present study, the control group was composed of HIV-negative siblings of HIV-positive children. This mode of selecting control subjects, used previously by Madigan et al.,<sup>32</sup> presents several advantages over randomly selected control subjects: 1) the need to test for HIV seroconversion is obviated since siblings of HIV-positive subjects are constantly tested for HIV infection; 2) it compensates for several environmental variables that might impact the prevalence of oral candidiasis and *Candida* spp. carriage, since subjects are living within the same household; 3) it provides an even distribution across socioeconomic strata of case and control groups and 4) it results in a homogeneous *Candida* spp. challenge via vertical and horizontal transmission.

Assessments of oral mucosal secretory function through measurements of total SIgA and *Candida*-specific SIgA, confirmed previous reports suggesting the maintenance of the responsiveness of the SIgA system during HIV infection.<sup>22,23,33-35</sup> Both total and specific IgA were elevated in HIV+ children, possibly as a response to the elevated stimulus provided by the opportunistic infections that accompany the progression of the HIV infection. We found a significant correlation between the yeast CFU/mL of saliva and the salivary levels of *Candida*-specific SIgA, suggesting that the secretory immune system was responding directly to the challenge presented by the *Candida* colonization or infection. Similar findings were described by Coogan et al.,<sup>22</sup> who reported a

significant correlation between whole saliva IgA antibodies to *Candida* spp. with the numbers of *Candida* organisms isolated from saliva. In AIDS+ patients there was a significant decrease in total SIgA, compared to AIDS- children. In addition, the presence of AIDS had a significant negative correlation with the salivary levels of SIgA. The implication of these findings is that with advanced immunosuppression, the secretory immune system starts to show signs of decay. Other reports have also described lower mean antibody levels in AIDS patients compared with HIV+ subjects.<sup>22,25</sup> However, the specific secretory immune response to *Candida* remained elevated despite the advent of AIDS, and the higher colonization by yeast in AIDS subjects was followed by a higher level of *Candida*-specific immunoglobulins.

HAART decreases the prevalence of oral lesions; particularly oral candidiasis in HIV-infected children.<sup>13,36</sup> Two mechanisms have been proposed to explain this finding: 1) a reduction in the infection as a result of the immune reconstitution resultant from the increase in numbers of CD4+ cells, and 2) a potential direct anti-yeast effect.<sup>18</sup> The protease inhibitors present in HAART can also inhibit candidal Saps, interfering with the growth and pathogenicity of *Candida* spp.<sup>19,37</sup> In a previous report, the start of HAART resulted in significant decreases in episodes of oral candidiasis, *Candida* carriage and salivary Saps only when protease inhibitors were part of the cocktail of antiretroviral drugs.<sup>38</sup> We also documented the beneficial effects of the use of antiretrovirals and HAART in several clinical and immunological parameters of the HIV infected children. Antiretroviral therapy was associated with significantly lower viral load, yeast CFU/mL and detection of *Candida*. The guidelines followed in Brazil for antiretroviral therapy of children recommend the administration of combination

therapy for patients who are symptomatic or have moderate to severe immunosuppression. Therefore, it was not surprising to observe that the prevalence of AIDS was significantly higher among HAART users, followed by antiretroviral users and antiretroviral non-users children.

Despite the higher number of AIDS cases in the HAART+ and AR+ groups compared with the AR- group, there were no differences in the levels of CD4+ cells among the 3 groups, suggesting that the antiretroviral therapies resulted in immune reconstitution. HAART+ and AR+ subjects also had a lower prevalence of oral candidiasis than AR- individuals and lower levels of total SIgA and *Candida*-specific SIgA. These associations suggest that either direct or indirect anticandidal effects of the antiretroviral therapies could be occurring, resulting in less yeast carriage and infection, inducing a decrease in the SIgA response.

The primary difference between antiretroviral users and HAART users was the use of protease inhibitors in the HAART regimen. This allowed us to make inferences about the potential direct anticandidal effects of protease inhibitors. The data suggested that the addition of protease inhibitors to the patient's drug regimen was associated with lower *Candida* carriage and infection, supporting an enhanced anticandidal effect. Although it is also possible that HAART resulted in a better immune reconstitution compared to the other antiretroviral regimens and an indirect anti-Candidal effect, the lack of difference in the percentage of CD4+ cells between the two groups argues against this hypothesis. These findings contrast with a recent study showing that prolonged HAART resulted in a major reduction in the prevalence of oral candidiasis from 10.6% to 2.1% ( $p < 0.01$ ), while the impact on *Candida*

recovery was less impressive, decreasing in prevalence from 57.0% to 46.5% ( $p > 0.05$ ).<sup>37</sup> In our sample the prevalence of oral candidiasis in HAART+ and AR+ children was quite similar; 8% vs. 4%, respectively (Table VI). Conversely, *Candida* spp. was found in 58% of HAART users compared to 88% of antiretroviral users patients and 100% of antiretroviral non-users subjects ( $p < 0.05$  [Table IV]). There were also significant differences in the mean yeast CFU/mL of saliva between the two groups; 21.3 vs. 83.5 for HAART and antiretroviral therapy users, respectively ( $p < 0.05$ ). Collectively these data suggest an anti-yeast effect of the protease inhibitors in HAART. It must be mention a potential limitation of our study, that was the fact we not collect information on the duration of AR or HAART use.

In summary, our data suggested that the use of antiretroviral therapy in HIV-positive children was associated with immune reconstitution, decreases in the prevalence of oral candidiasis and a lower *Candida* spp. carriage. The decrease in exposure to *Candida* spp. was accompanied by a decrease in levels of total SIgA and *Candida*-specific SIgA. Children who used protease inhibitors as part of the antiretroviral regimen in HAART showed additional reductions in oral candidiasis prevalence and candidal carriage. It is possible to speculate that the protease inhibitors might have had an anti-candidiasis effect, resulting not only from the immune reconstitution, but also from a direct anti-yeast mechanisms.

### **Acknowledgments**

This work was supported by the research grant DE-016700 from the National Institute of Dental and Craniofacial Research and by CNPq (305731/2003-3).

## References

1. Greenspan D, Greenspan JS. Oral manifestations of HIV infection. *AIDS Clin Care* 1997;9:29-33.
2. Ramos-Gomez FJ, Petru A, Hilton JF, Canchola AJ, Wara D, Greenspan JS. Oral manifestations and dental status in paediatric HIV infection. *Int J Paediatr Dent* 2000;10:3-11.
3. Blanchard A, Montagnier L, Gougeon ML. Influence of microbial infections on the progression of HIV disease. *Trends Microbiol* 1997;5:326-31.
4. Grimoud AM, Arnaud C, Dellamonica P, Lodter JP. Salivary defence factor concentrations in relation to oral and general parameters in HIV positive patients. *Eur J Oral Sci* 1998;106:979-85.
5. Klein RS, Harris CA, Small CB, Moll B, Lesser M, Friedland GH. Oral candidiasis in high-risk patients as the initial manifestation of the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1984;311:354-58.
6. Santos LC, Castro GF, de Souza IP, Oliveira RH. Oral manifestations related to immunosuppression degree in HIV-positive children. *Braz Dent J* 2001;12:135-8.
7. Costa CR, Cohen AJ, Fernandes OF, Miranda KC, Passos XS, Souza LK, et al. Asymptomatic oral carriage of *Candida* species in HIV-infected patients in the highly active antiretroviral therapy era. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2006;48:257-61.

8. Schmidt-Westhausen AM, Bendick C, Reichart PA, Samaranayake LP. Oral candidosis and associated *Candida* species in HIV-infected Cambodians exposed to antimycotics. *Mycoses* 2004;47:435-41.
9. Cauda R, Tacconelli E, Tumbarello M, Morace G, De Bernardis F, Torosantucci A, et al. Role of protease inhibitors in preventing recurrent oral candidosis in patients with HIV infection: a prospective case-control study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999;21:20-5.
10. Greenspan D, Gange SJ, Phelan JA, Navazesh M, Alves ME, MacPhail LA, et al. Incidence of oral lesions in HIV-1-infected women: reduction with HAART. *J Dent Res* 2004;83:145-50.
11. Tappuni AR, Fleming GJ. The effect of antiretroviral therapy on the prevalence of oral manifestations in HIV-infected patients: a UK study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;92:623-8.
12. Flanagan MA, Barasch A, Koenigsberg SR, Fine D, Houpt M. Prevalence of oral soft tissue lesions in HIV-infected minority children treated with highly active antiretroviral therapies. *Pediatr Dent* 2000;22:287-91.
13. Gona P, Van Dyke RB, Williams PL, Dankner WM, Chernoff MC, Nachman SA, et al. Incidence of opportunistic and other infections in HIV-infected children in the HAART era. *JAMA* 2006;296:292-300.
14. Khongkuntian P, Grote M, Isaratanan W, Piyaworawong S, Reichart PA. Oral manifestations in 45 HIV-positive children from Northern Thailand. *J Oral Pathol Med* 2001;30:549-52.

15. Okunseri C, Badner V, Wiznia A, Rosenberg M. Prevalence of oral lesions and percent CD4+ T-lymphocytes in HIV-infected children on antiretroviral therapy. *AIDS Patient Care STDS* 2003;17:5-11.
16. Soares LF, de Araujo Castro GF, de Souza IP, Pinheiro M. Pediatric HIV-related oral manifestations: a five-year retrospective study. *Braz Oral Res* 2004;18:6-11.
17. Flint SR, Tappuni A, Leigh J, Schmidt-Westhausen AM, MacPhail L. (B3) Markers of immunodeficiency and mechanisms of HAART therapy on oral lesions. *Adv Dent Res* 2006;19:146-51.
18. Powderly WG, Landay A, Lederman MM. Recovery of the immune system with antiretroviral therapy: the end of opportunism? *JAMA* 1998;280:72-7.
19. Borg-von Zepelin M, Meyer I, Thomssen R, Würzner R, Sanglard D, Telenti A, et al. HIV-Protease inhibitors reduce cell adherence of *Candida albicans* strains by inhibition of yeast secreted aspartic proteases. *J Invest Dermatol* 1999;113:747-51.
20. Lin AL, Johnson DA, Patterson TF, Wu Y, Lu DL, Shi Q, et al. Salivary anticandidal activity and saliva composition in an HIV-infected cohort. *Oral Microbiol Immunol* 2001;16:270-8.
21. Wray D, Felix DH, Cumming CG. Alteration of humoral responses to *Candida* in HIV infection. *Br Dent J* 1990;168:326-9.
22. Coogan MM, Sweet SP, Challacombe SJ. Immunoglobulin A (IgA), IgA1, and IgA2 antibodies to *Candida albicans* in whole and parotid saliva in

- human immunodeficiency virus infection and AIDS. *Infect Immun* 1994;62:892-6.
23. Drobacheff C, Millon L, Monod M, Piarroux R, Robinet E, Laurent R, et al. Increased serum and salivary immunoglobulins against *Candida albicans* in HIV-infected patients with oral candidiasis. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:519-26.
24. Sweet SP, Challacombe SJ, Naglik JR. Whole and parotid saliva IgA and IgA-subclass responses to *Candida albicans* in HIV infection. *Adv Exp Med Biol* 1995;371B:1031-4.
25. Castro GF, Souza IP, 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;19:281-8.
26. Challacombe SJ, Naglik JR. The effects of HIV infection on oral mucosal immunity. *Adv Dent Res* 2006;19:29-35.
27. CDC. 1994 Revised classification system for human immunodeficiency virus infection in children less than 13 years of age. *MMWR* 1994;43:1-19.
28. Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1994;32:1923-9.



29. Lamey PJ, Darwaza A, Fisher BM, Samaranayake LP, MacFarlane TN, Frier BM. Secretor status, candidal carriage and candidal infection in patients with diabetes mellitus. *J Oral Pathol* 1988;17:354-7.
30. Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology* 1995;141(Pt 7):1507-21.
31. Contreras I, Pontón J, Quindós G. Prevalence of *Candida parapsilosis* in the oral cavities of infants in Spain. *Clin Infect Dis* 1994;18:480-1.
32. Madigan A, Murray PA, Houpt M, Catalanotto F, Feuerman M. Caries experience and cariogenic markers in HIV-positive children and their siblings. *Pediatr Dent* 1996;18:129-36.
33. Belazi M, Fleva A, Drakoulakos D, Panayiotidou D. Salivary IgA and serum IgA and IgG antibodies to *Candida albicans* in HIV-infected subjects. *Int J STD AIDS* 2002;13:373-7.
34. Millon L, Drobacheff C, Piarroux R, Monod M, Reboux G, Laurent R, et al. Longitudinal study of anti-*Candida albicans* mucosal immunity against aspartic proteinases in HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001;26:137-44.
35. Wozniak KL, Leigh JE, Hager S, Swoboda RK, Fidel PL, Jr. A comprehensive study of *Candida*-specific antibodies in the saliva of human immunodeficiency virus-positive individuals with oropharyngeal candidiasis. *J Infect Dis* 2002;185:1269-76.

36. Miziara ID, Filho BC, Weber R. Oral lesions in Brazilian HIV-infected children undergoing HAART. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2006;70:1089-96.
37. Korting HC, Schaller M, Eder G, Hamm G, Bohmer U, Hube B. Effects of the human immunodeficiency virus (HIV) proteinase inhibitors saquinavir and indinavir on in vitro activities of secreted aspartyl proteinases of *Candida albicans* isolates from HIV-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2038-42.
38. Yang YL, Lo HJ, Hung CC, Li Y. Effect of prolonged HAART on oral colonization with *Candida* and candidiasis. *BMC Infect Dis* 2006;6:8-11.

## 5 DISCUSSÃO

Esta pesquisa teve a finalidade de investigar aspectos imunológicos em relação às *Candida* spp. em indivíduos infectados pelo HIV. Como justificativa para o estudo, pode-se considerar que o comportamento do sistema imune de pacientes com imunossupressão, mais especificamente em indivíduos infectados pelo HIV, tem sido pouco estudado, principalmente em relação aos patógenos ora investigados. Merece destaque também a inexistência, na literatura consultada, de pesquisas sobre o tema em crianças infectadas pelo HIV.

Deve-se, no entanto, realizar alguns comentários sobre a proposição e a metodologia empregadas neste trabalho. No primeiro estudo foi realizada uma revisão sistemática e, no segundo, uma pesquisa clínica. Os dois estudos tiveram como objetivo responder a um determinado questionamento, através de metodologias com comprovada evidência científica, que diferiram apenas quanto à faixa etária das populações estudadas. No caso do primeiro estudo, a pergunta formulada foi: os níveis de IgA específica para *Candida* spp. em pacientes adultos infectados pelo HIV estavam alterados em relação aos pacientes sem a infecção? Este estudo foi realizado, como já comentado, após constatar a inexistência de pesquisas em pacientes pediátricos, sendo a única alternativa investigar em indivíduos adultos. Sua proposta, através da revisão

sistemática, foi a de obter evidências científicas dos resultados esperados para o estudo 2. Neste tipo de estudo se efetua buscas em bases eletrônicas de dados bibliográficos e com isso se recupera sistematicamente trabalhos selecionados e originais, de acordo com critérios de inclusão e exclusão previamente estipulados pelo pesquisador. Dessa forma, são eliminados os vieses de seleção de trabalhos originais e há uma maior abrangência de trabalhos encontrados na literatura (FORREST et al., 2007; VIEIRA & HOSSNE, 2001). Neste sentido, foi realizada busca da literatura nas bases de dados Pubmed, Web of Science, Google Scholar, Cochrane e EMBASE com a finalidade de encontrar trabalhos publicados que atendessem aos critérios de inclusão. Após a seleção dos trabalhos, estes foram ainda avaliados quanto a sua qualidade metodológica e possibilidade de vieses.

Quanto à metodologia do estudo 2, optou-se pela realização de um estudo seccional clínico e laboratorial, com a finalidade de responder à mesma pergunta científica anteriormente mencionada, porém em uma população pediátrica, além de incluir não somente aos níveis de IgA-S específica, mas também os níveis de IgA-S total e a influência das medicações (anti-retrovirais e HAART) sobre estes pacientes. Segundo KLEIN & BLOCH (2002), este tipo de estudo visa a observação direta de determinada quantidade planejada de indivíduos em uma única oportunidade, estando ligado à necessidade de conhecer de que maneira uma ou mais características se distribuem em uma determinada população. Além disso, estes estudos são úteis para determinar a presença de antígenos, anticorpos e outros marcadores biológicos nos indivíduos.

A seleção da amostra se deu pela forma de conveniência, como anteriormente comentado no delineamento da pesquisa. Quanto ao tamanho amostral, deve-se enfatizar que neste período de 8 meses de coleta de material, todas as crianças que compareceram para atendimento no Ambulatório de AIDS Pediátrica do IPPMG, e que atendiam aos critérios de inclusão, foram selecionadas, totalizando uma amostra para o grupo infectado pelo HIV de 65 crianças. Como limitação para o tamanho da amostra, pode-se citar os constantes episódios de internação por parte de alguns pacientes, o que impossibilitava a consulta médica no ambulatório e conseqüentemente o atendimento dentário, já que este era realizado em um ambulatório próximo. Além disso, nem todas as crianças compareciam com assiduidade às consultas de revisão no ambulatório, o que determinou, nos últimos meses de coleta de dados, uma falta de pacientes novos para o estudo.

Quantos aos resultados, pode-se observar que na revisão sistemática, os indivíduos adultos infectados pelo HIV apresentaram uma maior resposta imunológica, já que os níveis de anticorpos específicos para as espécies de *Candida* se encontravam mais elevados, quando comparados com os níveis dos sujeitos sem a infecção. Merece destaque o fato de terem sido encontrados resultados semelhantes na população de crianças investigada no estudo seguinte.

A deficiência imunológica resultante da progressão da infecção pelo HIV tem sido apontada por diversos autores (BARASCH et al., 2000; COOGAN et al., 1994; FONSECA et al., 2000; GRANDO et al., 2002; GRIMOUD et al., 1998; KLEIN et al., 1984; OLANIYI & SUNDAY, 2005; RAMOS-GOMEZ et al., 1999; RAMOS-GOMEZ et al., 2000; SANTOS et al., 2001) como fator de risco

para o desenvolvimento de manifestações bucais, tais como a candidíase bucal. Este fato pode ser verificado no grupo de crianças infectadas pelo HIV onde a candidíase bucal foi a lesão mais encontrada (10,8%), depois da gengivite, lesão não relacionada com a infecção. Já no grupo controle, composto por irmãos saudáveis destas crianças, a única lesão encontrada foi a gengivite. Dentre os esquemas terapêuticos que foram desenvolvidos para estes pacientes infectados pelo HIV, destaca-se o HAART. A indicação desta terapia tem usado, como um dos critérios de seleção, a presença clínica da candidíase bucal (GREENSPAN & GREENSPAN, 2002), pois esta infecção oportunista está diretamente relacionada com a imunossupressão do indivíduo (GAIÁN-CEPEDA et al., 2002) e o conseqüente avanço da infecção. Assim, o HAART tem sido utilizado em pacientes com imunossupressão mais grave (GREENSPAN & GREENSPAN, 2002), nas quais a terapia combinada básica não mostra resultados.

Pode-se supor que a utilização do HAART, apontado em alguns estudos como responsável pela diminuição na prevalência de manifestações bucais (HAMZA et al., 2006; MIZIARA et al., 2006; OLANIYI & SUNDAY, 2005; PATTON et al., 2000; SOARES et al., 2004) e da candidíase orofaríngea (BEKTIC et al., 2001; BORG-VON ZEPELIN et al., 1999; YANG et al., 2006) pode ter contribuído para o percentual de lesões observadas na presente pesquisa, principalmente a candidíase bucal, levando a crer no desenvolvimento de um quadro de reconstituição imune nestes pacientes. Esta questão pode ser reforçada pela presença de maior prevalência de candidíase bucal (21,57% de candidíase pseudomembranosa e 5,88% de candidíase eritematosa) nas crianças deste mesmo ambulatório na década de 1990, como

constatado no estudo de FONSECA et al. (2000). Nessa época, o esquema terapêutico do HAART ainda não era utilizado por esses pacientes.

Uma maior redução de lesões bucais quando do uso do HAART, comparando com a terapia combinada básica com anti-retrovirais, poderia estar relacionada com a presença dos inibidores de proteases presentes neste esquema terapêutico. Estes inibidores parecem agir diretamente sobre as SAPs (Aspartil Proteases Secretoras), que são um fator de virulência das *Candida* spp. e que estão envolvidas na aderência destas na superfície tecidual, inibindo-as e desta forma produzindo um efeito antifúngico (BEKTIC et al., 2001; BORG-VON ZEPPELIN et al., 1999).

Muitas proteínas secretadas pelas glândulas salivares, como histatinas, lactoferrinas, lisozimas e IgA secretória, também possuem atividade antifúngica. No estudo seccional realizado, sugere-se o efeito desta última sobre a *Candida albicans*, podendo-se constatar níveis mais elevados de IgA-S total nas crianças infectadas em relação às sem a infecção. Perante estes resultados, pode-se supor que o aumento na resposta imune dos pacientes HIV positivos é provavelmente uma resposta a um número maior de antígenos na cavidade bucal destes pacientes, que apresenta como consequência um maior número de lesões oportunistas, como a candidíase bucal (COOGAN et al., 1994). Isto leva a crer que estas crianças podem manter uma capacidade de resposta imune intacta para estes antígenos presentes na mucosa.

Observa-se, na literatura, estudos em adultos com resultados semelhantes, nos quais foram detectados níveis mais elevados de IgA-S total em pacientes infectados e com a presença da candidíase bucal (BARD et al., 2002; DROBACHEFF et al., 2001) e também naqueles infectados pelo HIV e

portadores de *Candida* spp. (WRAY et al., 1990). Outros autores também observaram concentração mais elevada de IgA secretória nos pacientes adultos com a infecção, em comparação com o observado no grupo controle, sem a infecção (ATKINSON et al., 1990; GRIMOUD et al., 1998). No entanto, são escassas as pesquisas em uma população de crianças como a do presente estudo seccional. CASTRO et al. (2004), ao investigarem um grupo de crianças infectadas pelo HIV, verificaram níveis mais elevados de IgA salivar total nas crianças infectadas ao comparar com crianças sem a infecção. Este fato foi atribuído a uma resposta aos altos níveis de antígenos presentes na cavidade bucal desses pacientes.

Em se tratando de anticorpos específicos para determinado antígeno e particularmente a *Candida albicans*, alguns trabalhos (COOGAN et al., 1994; SWEET et al., 1995) indicam que há aumento na produção destes em pacientes infectados pelo HIV, o que foi verificado, da mesma forma, na presente pesquisa, principalmente na presença da candidíase bucal. No entanto, WRAY et al. (1990) encontraram níveis mais baixos destes anticorpos no grupo de pacientes com a infecção, em comparação com indivíduos sem a infecção, embora este último grupo não tenha sido testado para o diagnóstico do HIV. Já BELAZI et al. (2002) não encontraram diferença na concentração destes anticorpos entre os grupos de pacientes infectados e não infectados. Para estes achados distintos podem ser levantadas algumas hipóteses. Primeiro, pode-se especular que pacientes infectados pelo HIV podem ter uma função inadequada destes anticorpos, quando comparados com indivíduos saudáveis. Ou seja, apesar da alta produção de IgA-S, estas não são eficientes para debelar a candidíase (ATKINSON et al., 1990; COOGAN &



CHALLACOMBE, 2000; MILLON et al., 2001). Na segunda hipótese, pode-se estar diante de uma situação normal em um processo infeccioso, onde há um ponto crítico de níveis de antígenos, como o fungo, no qual os anticorpos salivares são ineficientes (CHALLACOMBE, 1994). Em terceiro lugar, pode-se apontar para uma maior patogenicidade das cepas de *Candida* nestes pacientes quando comparadas a cepas de *Candida* isoladas de indivíduos saudáveis (DROBACHEFF et al., 2001). Outra possibilidade que não se pode deixar de mencionar é a de outros fatores do sistema imune poderem estar comprometidos, como histatinas, lactoferrinas, lisozimas e citocinas, que desta forma não estão impedindo a instalação da lesão bucal (BARD et al., 2002; LIN et al., 2001).

O grau de comprometimento sistêmico destes pacientes também deve ser analisado. Acredita-se que à medida que a infecção vai se agravando, ou quando já se atinge o estágio de AIDS, a concentração de IgA-S tende a diminuir, como constatado na pesquisa realizada em uma população adulta por LIN et al. (2001). Segundo estes autores, os pacientes com a infecção em estágio mais avançado apresentavam a atividade salivar antifúngica diminuída. CASTRO et al. (2004) também verificaram concentração de anticorpos específicos para microorganismos cariogênicos mais baixa em um grupo de crianças infectadas pelo HIV, com imunossupressão mais grave. Porém WOZNIAK et al. (2002) não encontraram diferença na concentração destes anticorpos nos pacientes adultos com diferentes graus de imunossupressão. Na presente pesquisa observa-se que as crianças com maior imunossupressão apresentavam valores mais baixos de IgA-S total ( $165,5 \pm 80,3$  e  $126,7 \pm 69,0$ , respectivamente nos grupos sem AIDS e com AIDS). Já com relação à IgA-S

específica, observou-se resultados diferentes com níveis ligeiramente mais elevados no grupo que apresentava AIDS ( $31,5 \pm 21,3$  e  $44,3 \pm 83,4$ , respectivamente nos grupos sem AIDS e com AIDS). Pode-se supor, neste caso, que, apesar da diminuição da atividade das células CD4, o sistema imune nesta população ainda é capaz de induzir uma resposta aparentemente normal da mucosa para microrganismos bucais.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Deve-se considerar a importância de estudos como este, que investiguem aspectos clínicos, microbiológicos, e principalmente imunológicos em pacientes com comprometimento sistêmico, como os selecionados neste trabalho. A determinação da prevalência de anticorpos totais, e principalmente anticorpos específicos, pode ser relevante para avaliar o estabelecimento de estratégias de prevenção e tratamento.

Outro aspecto que se torna importante para este universo de indivíduos são os estudos que avaliam a resposta do paciente frente às medicações em uso, no caso, os anti-retrovirais e o HAART. Novos trabalhos que investiguem esta resposta e correlacionem com o tempo de uso da terapia medicamentosa, variável não investigada nesta pesquisa, contribuirão para um melhor conhecimento do mecanismo do sistema imune destes indivíduos. Merece investigação também, avaliar a adesão da criança ao uso do HAART, pois esta terapia é fortemente associada com a diminuição na prevalência de manifestações bucais e a reconstituição imune do indivíduo.

Por fim, considerando a escassez de estudos que analisam simultaneamente parâmetros clínicos, microbiológicos e imunológicos em indivíduos infectados pelo HIV, sugere-se investigar estes aspectos em um maior número de indivíduos, particularmente em crianças, que apesar de não

terem seu sistema imunológico plenamente desenvolvido, mostraram resultados similares aos observados em estudos com adultos.

## 7 CONCLUSÕES

Os indivíduos infectados pelo HIV (crianças e adultos) mantiveram sua capacidade de resposta imunológica para as *Candida* spp., considerando que a dosagem de IgA-S específica para este patógeno se encontrava mais elevada.

7.1 Através da revisão sistemática da literatura, foi observado que os pacientes adultos infectados pelo HIV apresentaram maior resposta imunológica, pois os níveis de imunoglobulinas salivares específicas para *Candida albicans* se encontravam mais elevados do que o observado em indivíduos sem a infecção.

7.2 Os níveis de imunoglobulinas salivares totais e específicas anti-*Candida* spp. foram significativamente mais elevados nas crianças infectadas pelo HIV em comparação aos seus irmãos não infectados.

7.3 Foram observados níveis mais baixos de imunoglobulinas salivares totais e específicas nas crianças que usavam medicação anti-retroviral (AR e HAART), sendo significante os níveis de imunoglobulinas salivares totais. Os níveis de imunoglobulinas salivares totais foram também significativamente menores nas crianças com imunossupressão mais grave. Já os níveis de imunoglobulinas salivares específicas foram mais elevados nas crianças com imunossupressão

mais grave, porém sem significância. Foi observada também, uma correlação positiva quanto aos níveis de anticorpos e as *Candida* spp. Quanto à influência das medicações anti-retrovirais, pode-se observar que o uso da terapia medicamentosa foi associado com a diminuição na prevalência da candidíase bucal e dos níveis de anticorpos totais e específicos para *Candida* spp.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ATKINSON, J.C.; YEH, C.; OPPENHEIM, F.G.; BERMUDEZ, D.; BAUM, B.J.; FOX, P.C. Elevation of salivary antimicrobial proteins following HIV-1 infection. **J Acquir Immune Defic Syndr**, New York, v.3, n.1, p.41-48, 1990.

BARASCH, A.; SAFFORD, M.M.; CATALANOTTO, F.A.; FINE, D.H.; KATZ, R.V. Oral soft tissue manifestation in HIV-positive vs. HIV-negative children from an inner city population: A two-year observational study. **Pediatr Dent**, Chicago, v.22, n.3, p.215-220, May/Jun., 2000.

BARD, E.; LAIBE, S.; CLAIR, S.; BIICHLÉ, S.; MILLON, L.; DROBACHEFF, C.; BETTINGER, D.; SEILLES, E.; MEILLET, D. Nonspecific secretory immunity in HIV-infected patients with oral candidiasis. **J Acquir Immune Defic Syndr**, New York, v.31, n.3, p.276-284, Nov., 2002.

BEKTIC, J.; LELL, C.P.; FUCHS, A.; STOIBER, H.; SPETH, C.; LASS-FLÖRL, C.; BORG-VON ZEPELIN, M.; DIERICH, M.P.; WÜRZNER, R. HIV protease inhibitors attenuate adherence of *Candida albicans* to epithelial cells in vitro. **FEMS Immunol Med Microbiol**, Oxford, v.31, n.1, p.65-71, Jul., 2001.

BELAZI, M.; FLEVA, A.; DRAKOULAKOS, D.; PANAYIOTIDOU, D. Salivary IgA and serum IgA and IgG antibodies to *Candida albicans* in HIV-infected subjects. **Int J Std AIDS**, London, v.13, n.6, p.373-377, Jun., 2002.

BORG-VON ZEPELIN, M.; MEYER, I.; THOMSEN, R.; WÜRZNER, R.; SANGLARD, D.; TELENTI, A.; MONOD, M. HIV-Protease inhibitors reduce cell adherence of *Candida albicans* strains by inhibition of yeast secreted aspartic proteases. **J Invest Dermatol**, Baltimore, v.113, n.5, p.747-751, Nov., 1999.

CASSONE, A.; DE BERNARDIS, F.; TOROSANTUCCI, A.; TACCONELLI, E.; TUMBARELLO, M.; CAUDA, R. In vitro and in vivo anticandidal activity of human immunodeficiency virus protease inhibitors. **J Infect Dis**, Chicago, v.180, n.2, p.448-453, Aug., 1999.

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**, Oxford, v.19, n.5, p.281-288, Oct., 2004.

CERQUEIRA, D.F.; PORTELA, M.B.; POMARICO, L.; SOARES, R.M.; de SOUZA, I.P.; CASTRO, G.F. Examining dentinal carious lesions as a predisposing factor for the oral prevalence of *Candida* spp in HIV-infected children. **J Dent Child**, Chicago, v.74, n.2, p.98-103, May/Aug., 2007.

CHALLACOMBE, S.J. Immunologic aspects of oral candidiasis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v.78, n.2, p.202-210, Aug., 1994.

COLEMAN, D.C.; RINALDI, M.G.; HAYNES, K.A.; REX, J.H.; SUMMERBELL, R.C.; ANAISSIE, E.J.; LI, A.; SULLIVAN, D.J. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. **Med Mycol**, New York, v.36, Suppl 1, p. 156-165, 1998.

COOGAN, M.M.; SWEET, S.P.; CHALLACOMBE, S.J. Immunoglobulin A (IgA), IgA1, and IgA2 antibodies to *Candida albicans* in whole and parotid saliva in human immunodeficiency virus infection and AIDS. **Infect Immun**, Washington, v. 62, n.3, p.892-896, Mar., 1994.



COOGAN, M.M.; CHALLACOMBE, S.J. Serum and salivary antibodies to a mycobacterial 65-kDa stress protein are elevated in HIV-positive patients and modified by oral candidiasis. **Oral Microbiol Immunol**, Oxford, v.15, n.5, p.284-289, Oct., 2000.

COSTA, C.R.; DE LEMOS, J.A.; PASSOS, X.S.; ARAÚJO, C.R.; COHEN, A.J.; SOUZA, L.K; FERNANDES, O.F.; SALES, W.S.; SILVA, M.R. Species distribution and antifungal susceptibility profile of oral candida isolates from HIV-infected patients in the antiretroviral therapy era. **Mycopathologia**, Deng Haag, v.162, n.1, p.45-50, Jul., 2006.

DROBACHEFF, C.; MILLON, L.; MONOD, M.; PIARROUX, R.; ROBINET, E.; LAURENT, R.; MEILLET, D. Increased serum and salivary immunoglobulins against *Candida albicans* in HIV-infected patients with oral candidiasis. **Clin Chem Lab Med**, Berlin, v.39, n.6, p.519-526, Jun., 2001.

FETTER, A.; PARTISANI, M.; KOENIG, H.; KREMER, M.; LANG, J.M. Asymptomatic oral *Candida albicans* carriage in HIV-infection: frequency and predisposing factors. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.22, n.2, p.57-59, Feb., 1993.

FONSECA, R.; CARDOSO, A.S.; POMARICO, I. Frequency of oral manifestations in children infected with human immunodeficiency vírus. **Quintessence Int**, Berlin, v.31, n.6, p.419-422, Jun., 2000.

FORREST, J.L.; MILLER, S.A.; NEWMAN, M.G. Introdução à tomada de decisão baseada em evidência. In: NEWMAN, M.G.; TAKEI, H.; CARRANZA, F.A.Jr.; KLOKKEVOLD, P.R. **Carranza periodontia clínica**. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2007, p.12-21.

GAITÁN-CEPEDA, L.; CASHAT-CRUZ, M.; MORALES-AGUIRRE, J.J.; SÁNCHEZ-VARGAS, L.; AQUINO-GARCIA, S.; FRAGOSO-RÍOS, R.; CUAIRÁN-RUIDIAZ, V.; AVILA-FIGUEROA, C. Prevalence of oral lesions in

mexican children with perinatally acquired HIV: association with immunologic status, viral load, and gender. **AIDS Patient Care STDS**, New York, v.16, n.4, p.151-156, Apr., 2002.

GAITAN-CEPEDA, L.A.; CEBALLOS-SALOBREÑA, A.C.; LÓPEZ-ORTEGA, K.; ARZATE-MORA, N.; JIMÉNEZ-SORIANO, Y. Oral lesions and immune reconstitution syndrome in HIV+/AIDS patients receiving highly active antiretroviral therapy. Epidemiological evidence. **Med Oral Patol Cir Bucal**, Valencia, v.13, n.2, p.E85-93, Feb., 2008.

GRANDO, L.J.; YURGEL, L.S.; MACHADO, D.C.; SILVA, C.L.; MENEZES, M.; PICOLLI, C. Manifestações estomatológicas, contagem de linfócitos T-CD4+ e carga viral de crianças brasileiras e norte-americanas infectadas pelo HIV. **Pesqui Odontol Bras**, São Paulo, v.16, n.1, p.18-25, Jan./Mar., 2002.

GREENSPAN, J.S., GREENSPAN, D. The epidemiology of the oral lesions of HIV infection in the developed world. **Oral Dis**, Oxford, v.8, suppl 2, p.34-39, 2002.

GRIMOUD, A.M.; ARNAUD, C.; DELLAMONICA, P.; LODTER, J.P. Salivary defence factor concentrations in relation to oral and general parameters in HIV positive patients. **Eur J Oral Sci**, Göteborg, v.106, n.6, p.979-985, Dec., 1998.

HAMZA, O.J.M.; MATEE, M.I.N.; SIMON, E.N.M.; KIKWILU, E.; MOSHI, M.J.; MUGUSI, F.; MIKX, F.H.; VERWEIJ, P.E.; VAN DER VEN, A.J. Oral manifestations of HIV infection in children and adults receiving highly active anti-retroviral therapy [HAART] in Dar es Salaam, Tanzania. **BMC Oral Health**, London, v.6, n.12, p.1-9, 2006.

HODGSON, T.A.; GREENSPAN, D.; GREENSPAN, J.S. Oral lesions of HIV disease and HAART in industrialized countries. **Adv Dent Res**, Washington, v.19, n.1, p.57-62, Apr., 2006.

JORDAN, R.; GOLD, L.; CUMMINS, C.; HYDE, C. Systematic review and metanalysis of evidence for increasing numbers of drugs in antiretroviral combination therapy. **BMJ**, London, v.324, n.7340, p.757, Mar., 2002.

KLEIN, C.H.; BLOCH, K.V. Estudos seccionais. In: MEDRONHO, R.A. **Epidemiologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2002, p.125-150.

KLEIN, R.S.; HARRIS, C.A.; SMALL, C.B.; MOLL, B.; LESSER, M.; FRIEDLAND, G.H. Oral candidiasis in high-risk patients as the initial manifestation of the acquired immunodeficiency syndrome. **N Engl J Med**, Boston, v.311, n.6, p.354-358, Aug., 1984.

LAWN, S.D.; WILKONSON, R.J. Immune reconstitution disease associated with parasitic infections following antiretroviral treatment. **Parasite Immunol**, Oxford, v.28, n.11, p.625-633, Nov., 2006.

LIN, A.L.; JOHNSON, D.A.; PATTERSON, T.F.; WU, Y.; LU, D.L.; SHI, Q.; YEH, C.K. Salivary anticandidal activity and saliva composition in an HIV-infected cohort. **Oral Microbiol Immunol**, Oxford, v.16, n.5, p.270-278, Oct., 2001.

LYON, J.P.; COSTA, S.C.; TOTTI, V.M.; MUNHOZ, M.F.; RESENDE, M.A. Predisposing conditions for *Candida* spp. carriage in the oral cavity of denture wearers and individuals with natural teeth. **Can J Microbiol**, Saskatoon, v.52, n.5, p.462-467, May, 2006.

MANN, J.M.; TARANTOLA, D.J.M. HIV 1998: The global picture. **Sci Am**, New York, v.279, n.1, p.82-83, Jul., 1998.

MILLON, L.; DROBACHEFF, C.; PIARROUX, R.; MONOD, M.; REBOUX, G.; LAURENT, R.; MEILLET, D. Longitudinal study of anti-*Candida albicans* mucosal immunity against aspartic proteinases in HIV-infected patients. **J Acquir Immune Defic Syndr**, New York, v.26, n.2, p.137-144, Feb., 2001.

MIZIARA, I.D., ARAÚJO FILHO, B.C., WEBER, R. Oral lesions in brazilian HIV-infected children undergoing HAART. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**, Amsterdam, v.70, n.6, p.1089-1096, Jun., 2006.

ODDEN, K.; SCHENCK, K.; KOPPANG, H.S.; HURLEN, B. Candidal infection of the gengiva in HIV-infected persons. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.23, n.4, p.178-183, Apr., 1994.

OLANIYI, T.O.; SUNDAY, P. Oral manifestations of HIV infection in 36 nigerian children. **J Clin Pediatr Dent**, Birmingham, v.30, n.1, p.89-92, Fall, 2005.

OLIVEIRA, R.H.S.; ABREU, T.F. Aspectos médicos da criança infectada pelo HIV. In: SOUZA, I.P.R.; CASTRO, G.F. **Abordagem odontológica da criança infectada pelo HIV**. São Paulo: Santos livraria editora, 2008, p.61-86.

PATTON, L.L.; McKAIG, R.; STRAUSS, R.; ROGERS, D.; ERON, J.J. Changing prevalence of oral manifestations of human immunodeficiency virus in the era of protease inhibitor therapy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v.89, n.3, p.299-304, Mar., 2000.

POLLOCK, J.J.; SANTARPIA III, R.P.; HELLER, H.M.; XU, L.; LAL, K.; FUHRER, J.; KAUFMAN, F.W.; STEIGBIGEL, R.T. Determination of salivary anticandidal activities in healthy adults and patients with AIDS: a pilot study. **J Acquir Immune Defic Syndr**, New York, v.5, n.6, p.610-618, 1992.

PUGLIESE, A.; TORRE, D.; BACCINO, F.M.; DI PERRI, G.; CANTAMESSA, C.; GERBAUDO, L.; SAINI, A.; VIDOTTO, V. *Candida albicans* and HIV-1 infection. **Cell Biochem Funct**, Guildford, v.18, n.4, p.235-241, Dec., 2000.

RAMOS-GOMEZ, F.J.; FLAITZ, C.; CATAPANO, P.; MURRAY, P.; MILNES, A.R.; DORENBAUM, A. Classification, diagnostic criteria, and treatment recommendations for orofacial manifestations in HIV-infected pediatric patients. Collaborative Workgroup on Oral Manifestations of Pediatric HIV infection. **J Clin Pediatr Dent**, Birmingham, v.23, n.2, p.85-95, Winter, 1999.

RAMOS-GOMEZ, F.J.; PETRU, A.; HILTON, J.F.; CANCHOLA, A.J.; WARA, D.; GREENSPAN, J.S. Oral manifestations and dental status in paediatric HIV infection. **Int J Paediatric Dent**, Oxford, v.10, n.1, p.3-11, Mar., 2000.

RUTHERFORD, G.W.; SANGANI, P.R.; KENNEDY, G.E. Three- or four- versus two-drug antiretroviral maintenance regimens for HIV infection. **Cochrane Database Syst Rev**, Oxford, v.4, p.CD002037, 2003.

SAMARANAYAKE, L.P. Host factors and oral candidosis. In: SAMARANAYAKE, L.P.; MacFARLANE, T.W. editors. **Oral candidosis**. London: Butterworth & Co, 1990, p.66-103.

SÁNCHEZ-VARGAS, L.O.; ORTIZ-LÓPEZ, N.G.; VILLAR, M.; MORAGUES, M.D.; AGUIRRE, J.M.; CASHAT-CRUZ, M.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; GAITÁN-CEPEDA, L.A.; QUINDÓS, G. Point prevalence, microbiology and antifungal susceptibility patterns of oral *Candida* isolates colonizing or infecting Mexican HIV/AIDS patients and healthy persons. **Rev Iberoam Micol**, Bilbao, v.22, n.2, p.83-92, 2005.

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

SCHMIDT-WESTHAUSEN, A.M.; BENDICK, C.; REICHART, P.A.; SAMARANAYAKE, L.P. Oral candidosis and associated *Candida* species in HIV-infected Cambodians exposed to antimycotics. **Mycoses**, Berlin, v.47, n.9-10, p.435-441, Oct., 2004.

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**, São Paulo, v.18, n.1, p.6-11, Jan./Mar., 2004.

STARR, J.R.; WHITE, T.C.; LEROUX, B.G.; LUIS, H.S.; BERNARDO, M.; LEITAO, J.; ROBERTS, M.C. Persistence of oral *Candida albicans* carriage in healthy Portuguese schoolchildren followed for 3 years. **Oral Microbiol Immunol**, Oxford, v.17, n.5, p.304-310, Oct., 2002.

SULLIVAN, D.J.; WESTERNENG, T.J.; HAYNES, K.A.; BENNETT, D.E.; COLEMAN, D.C. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidiasis in HIV-infected individuals. **Microbiology**, Washington, v.141, n. Pt 7, p.1507-1521, Jul., 1995.

SVANBORG-EDÉN, C.; SVENNERHOLM, A.M. Secretory immunoglobulin A and G antibodies prevent adhesion of *Escherichia coli* to human urinary tract epithelial cells. **Infect Immun**, Washington, v.22, n.3, p.790-797, Dec., 1978.

SWEET, S.P.; RAHMAN, D.; CHALLACOMBE, S.J. IgA subclasses in HIV disease: dichotomy between raised levels in serum and decreased secretion rates in saliva. **Immunology**, Oxford, v.86, n.4, p.556-559, Dec., 1995.

TEANPAISAN, R.; NITTAYANANTA, W. Prevalence of *Candida* species in AIDS patients and HIV-free subjects in Thailand. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.27, n.1, p.4-7, Jan., 1998.

TORSSANDER, J.; MORFELDT-MÅNSON, L.; BIBERFELD, G.; KARLSSON, A.; PUTKONEN, P.; WASSERMAN, J. Oral *Candida albicans* in HIV infection. **Scand J Infect Dis**, Stockholm, v.19, n.3, p.291-295, 1987.

UGUN-CAN, B.; KADIR, T.; AKYÜZ, S. Oral candidal carriage in children with and without dental caries. **Quintessence Int**, Berlin, v.38, n.1, p.45-49, Jan., 2007.

UNAIDS, WHO. AIDS epidemic update: december 2007. Disponível em: [www.unaids.org](http://www.unaids.org). Acesso em: 15 jun. 2008.

VASELIU, N.; CARTER, A.B.; KLINE, N.E.; KOZINETZ, C.; CRON, S.G.; MATUSA, R.; KLINE MW. Longitudinal study of the prevalence and prognostic implications of oral manifestations in romanian children infected with human immunodeficiency virus type 1. **Pediatr Infect Dis J**, Arlington, v.24, n.12, p.1067-1071, Dec., 2005.

VIEIRA, S.; HOSSNE, W.S. Revisão bibliográfica e meta-análise. In: VIEIRA, S.; HOSSNE, W.S. **Metodologia científica para a área da saúde**. Rio de Janeiro: Campus, 2001, p.135-154.

VUDHICHAMNONG, K.; WALKER, D.M.; RYLEY, H.C. The effect of secretory immunoglobulin A on the *in-vitro* adherence of the yeast *Candida albicans* to human oral epithelial cells. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.27, n.8, p.617-621, 1982.

WHITE, R.R. Imunoterapia. In: NEIDLE, E.A., YAGIELA, J.A. **Farmacologia e terapêutica para dentistas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991, p.456-462.

WOZNIAK, K.L.; LEIGH, J.E.; HAGER, S.; SWOBODA, R.K.; FIDEL JR, P.L. A comprehensive study of Candida-specific antibodies in the saliva of human immunodeficiency virus-positive individuals with oropharyngeal candidiasis. **J Infect Dis**, Chicago, v.185, n.9, p.1269-1276, May, 2002.

WRAY, D.; FELIX, D.H.; CUMMING, C.G. Alteration of humoral responses to *Candida* in HIV infection. **Br Dental J**, London, v.168, n.8, p.326-329, Apr., 1990.

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

## **ANEXOS**



## ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO DE JANEIRO  
UFRJ

INSTITUTO DE PUERICULTURA E PEDIATRIA MARTAGÃO GESTEIRA

**MEMORANDO DE APROVAÇÃO**

O projeto "Imunoglobulinas salivares e sua relação com *Cândida ssp*, em crianças infectadas pelo HIV", de responsabilidade da Dra. Luciana Pomarico Ribeiro, foi analisado pelo CEP/IPPMG e aprovado em 3 de maio de 2005.

Rio de Janeiro, 3 de maio de 2005

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Ricardo Hugo da Silva e Oliveira". The signature is stylized and cursive.

Ricardo Hugo da Silva e Oliveira  
Coordenador do CEP/IPPMG

**ANEXO 2****Projeto de Pesquisa em Odontopediatria (FO/UFRJ)****Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Prezado responsável,

A Disciplina de Odontopediatria da UFRJ e o IPPMG estão estudando os tipos de microorganismos que habitam a boca das crianças. Para isso, será necessário colher um pouco da saliva 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 atendimento pela técnica de restauração atraumática, e aquela com necessidade de extrações será encaminhada para a Clínica de Odontopediatria – FO/UFRJ.

O estudo está em consonância com o estabelecido na Resolução do CNS 196/96. 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 a saliva não causarão, de maneira alguma, nenhum dano à criança.

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

Qualquer comunicação necessária será feita através de carta ou telegrama. Em caso de dúvidas ou necessidades, o responsável poderá entrar em contato com:

CEP/ IPPMG (Av. Brigadeiro Trompowsk, s/nº, UFRJ - Ilha do Fundão

Cep: 21941-590 Tel: (21) 2562-6139

Dra. Daniella Ferraz Cerqueira Tel: (21) 2244-7707 e Dra. Luciana Pomarico Ribeiro.

Alunas de Pós-Graduação em Odontopediatria FO/ Dept. Odontopediatria e Ortodontia. Tel: 2562-2101

Estou ciente do que foi proposto acima e autorizo a participação:

-----  
Nome da criança

-----  
(Assinatura do Responsável)

-----  
(Assinatura do Pesquisador)

Data: ---/---/---

## ANEXO 3

**FICHA CLÍNICA**  
**Projeto AIDS em Odontopediatria**


---



---

**IDENTIFICAÇÃO**

Nome: \_\_\_\_\_

Prontuário: \_\_\_\_\_

DN: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ sexo: \_\_\_ cor: \_\_\_ naturalidade: \_\_\_\_\_

Mãe: \_\_\_\_\_ HIV (+) (-)

Pai: \_\_\_\_\_ HIV (+) (-)

End: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

Responsável: \_\_\_\_\_

Parentesco: \_\_\_\_\_

Profissão do Responsável: \_\_\_\_\_

**Data do Exame:** \_\_\_\_\_**1) HISTÓRIA CLÍNICA**

Classificação Clínica: \_\_\_\_\_

Tipo de transmissão: (V) (T) (S) (D) (?)

Se transmissão vertical:

Fator de risco materno para infecção pelo HIV: \_\_\_\_\_

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: \_\_\_\_\_

Classificação na 1ª consulta DIP-Imuno: \_\_\_\_\_

Manifestação inicial da infecção pelo HIV:

( ) febre ( ) adenomegalias ( ) hepatomegalia ( ) esplenomegalia

( ) diarreia crônica ( ) PCP ( ) infecção bacteriana de repetição

( ) ↑ parótida ( ) anemia ( ) leucopenia ( ) plaquetopenia

( ) atraso desenvolvimento ( ) emagrecimento ( ) outros \_\_\_\_\_

Doenças definidoras de SIDA ou outras marcantes:

*Encefalopatia pelo HIV*: data: \_\_\_\_\_  
*Retinite por CMV*: data: \_\_\_\_\_  
*Retinite por toxo*: data: \_\_\_\_\_  
*Neurotoxó*: data: \_\_\_\_\_  
*LIP*: data: \_\_\_\_\_  
*Micobacteriose*: data: \_\_\_\_\_  
*Tuberculose*: data: \_\_\_\_\_  
*PCP*: data: \_\_\_\_\_  
*DPC*: \_\_\_\_\_ grau Gomez data: \_\_\_\_\_  
*Infecção bacteriana grave recorrente*: data: \_\_\_\_\_  
*Plaquetopenia*: data: \_\_\_\_\_  
*Esofagite*: data: \_\_\_\_\_ Agente: \_\_\_\_\_  
*Miocardiopatia*: data: \_\_\_\_\_  
*Herpes Zoster*: data: \_\_\_\_\_  
 Outras: \_\_\_\_\_

Faz uso de antiretroviral : ( ) S ( ) N Qual: ( ) AZT ( ) 3TC ( ) DDI  
 Tempo: \_\_\_\_\_  
 Se soroconverteur: data: \_\_\_\_\_  
 Alta: data: \_\_\_\_\_ Óbito: data: \_\_\_\_\_ causa mortis: \_\_\_\_\_

## 2) EXAME ORAL

História prévia de manifestação oral: ( ) S ( ) N  
 Qual: \_\_\_\_\_

Tecidos Moles:

Extra Oraís:

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: \_\_\_\_\_

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: \_\_\_\_\_

CPOD / ceo e CPOS / ceos:

CPOD: \_\_\_\_\_ ceo: \_\_\_\_\_  
 CPOS: \_\_\_\_\_ ceos: \_\_\_\_\_

Dente	dist	Vest	mes	Lin	oclus
51					
52					
53					
54					
55					
6					
7					
8					

	Dist	vest	mes	Lin	Oclus
61					
62					
63					
64					
65					
6					
7					
8					

Dente	dist	Vest	mes	Lin	oclus
71					
72					
73					
74					
75					
6					
7					
8					

	Dist	vest	mes	Lin	Oclus
81					
82					
83					
84					
85					
6					
7					
8					

0 - sadia

1 - cárie inativa 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

**3) EXAMES LABORATORIAIS**

Data					Data	
CD4					Ht/Hb	
CD8					Leucócitos	
T4/T8					plaquetas	
					VHS	



# 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](#)