

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

**Madeleine Souza das Chagas**

**PREVALÊNCIA DE *Candida* spp. ISOLADAS DA MUCOSA  
BUCAL E DE LESÕES CARIOSAS CAVITADAS EM  
DENTINA DE CRIANÇAS INFECTADAS PELO HIV**

**Rio de Janeiro**  
**2008**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

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

**Madeleine Souza das Chagas**

**PREVALÊNCIA DE *Candida* spp. ISOLADAS DA MUCOSA  
BUCAL E DE LESÕES CARIOSAS CAVITADAS EM  
DENTINA DE CRIANÇAS INFECTADAS PELO HIV**

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

Orientadoras:

**Prof. Dra. Glória Fernanda Barbosa de Araújo Castro**  
**Prof. Dra. Rosângela Maria Araújo Soares**

**Rio de Janeiro**

**2008**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Chagas, Madeleine Souza das

Prevalência de *Candida* spp. isoladas da mucosa bucal e de lesões cariosas cavitadas em dentina de crianças infectadas pelo HIV / Madeleine Souza das Chagas. – Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Odontologia, 2008.

xiv, 71 f. : il. ; 31 cm.

Orientadores: Glória Fernanda Barbosa de Araújo Castro e Rosângela Maria Araújo Soares

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação Odontologia, Odontopediatria, 2008.

Referências bibliográficas: f. 59-63

1. *Candida* - enzimiologia. 2. Colágeno tipo I. 3. Cárie dentária . 4. Imunossupressão . 5. HIV . 6. Crianças . 7. Prevalência. 8. Odontopediatria -Tese. I. Castro, Glória Fernanda Barbosa de Araújo. II. Soares, Rosângela Maria Araújo. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia Programa de Pós-Graduação Odontologia, Odontopediatria. IV. Título.

**FOLHA DE APROVAÇÃO****MADELEINE SOUZA DAS CHAGAS**

**“PREVALÊNCIA DE *Candida* spp. ISOLADAS DA MUCOSA BUCAL E DE LESÕES CARIOSAS CAVITADAS EM DENTINA DE CRIANÇAS INFECTADAS PELO HIV”.**

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

Rio de Janeiro, 29 de fevereiro de 2008.

---

Profa. Dra. Glória Fernanda Barbosa de Araújo Castro  
DO - Profa. Adjunto do Depto. de Odontopediatria e Ortodontia da FO-UFRJ

---

Profa. Dra. Rosangela Maria de Araújo Soares  
DO - Profa. Adjunta do Instituto de Microbiologia - Depto. de Microbiologia Geral –  
UFRJ

---

Prof. Dr. Milton de Uzeda  
DO - Prof. Adjunto do Instituto de Microbiologia – Depto. de Microbiologia Médica -  
UFRJ

---

Profa. Dra. Lucianne Cople Maia de Faria  
DO - Profa. Adjunta do Depto. de Odontopediatria e Ortodontia da FO-UFRJ

---

Profa. Dra. Maristela Barbosa Portela  
DO - Profa. Assistente da Disciplina de Pacientes Especiais e Cariologia da FO-  
Sociedade Pestalozzi - RJ

## DEDICATÓRIA

*AOS MEUS PAIS **INAJAR** E **LÉDA** E AOS MEUS IRMÃOS, **IVSON** E **IGOR**, PELO INCENTIVO, COMPANHEIRISMO E AMOR INCONDICIONAL SEMPRE E, PELA COMPREENSÃO NOS MEUS MOMENTOS MAIS “ESTRESSADOS”, DURANTE ESTA CAMINHADA. SEI QUE NÃO FOI FÁCIL PARA VOCÊS TAMBÉM. POR ISSO, DEDICO A CONQUISTA DE MAIS ESTE SONHO ÀS PESSOAS MAIS IMPORTANTES DA MINHA VIDA, VOCÊS. AMO VOCÊS!*

## AGRADECIMENTOS

A **Deus** por iluminar sempre meu caminho e nunca me deixar desistir dos meus sonhos. Obrigada, Senhor, por permitir a realização de mais um sonho.

À todos os meus **familiares** que sempre estiveram ao meu lado, acreditando em meus sonhos.

À **Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Glória Fernanda, grande e eterna amiga**, que em todos esses anos de amizade sempre acreditou em mim. Agradeço por todos os ensinamentos, dedicação e cumplicidade. Obrigada por me confiar sua amizade verdadeira e me proporcionar momentos de grandes alegrias. Este é mais um fruto do nosso trabalho!

À **Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Rosangela** que, além de amiga e muito querida, é para mim um exemplo de dedicação e competência. Obrigada pelos ensinamentos que me foram passados. Como dizem meus pais, “educação e ensinamentos são as únicas heranças que ninguém pode nos tirar”. Por isso agradeço a oportunidade e confiança depositadas em mim. A você minha eterna admiração!

À querida amiga **Maristela**, dizer simplesmente obrigada, não seria suficiente para agradecer a enorme dedicação e carinho. Obrigada pela amizade e companheirismo. Você é um exemplo para mim!

À **Daniella**, que, mesmo distante foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço pela disponibilidade, amizade e carinho. Muito obrigada!

À **Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Ivete Pomarico Ribeiro de Souza**, pelos ensinamentos, disponibilidade e carinho. A senhora é, para mim, um exemplo de competência. Obrigada pela oportunidade!

A **Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Laura Primo**, pela oportunidade de participar deste curso, pelas palavras amigas e confiança em mim depositada. E, mesmo distante, sei que continua torcendo por nós. Saudades!

À **Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Lucianne Cople Maia**, pela amizade e por acreditar sempre em mim. Agradeço pelo incentivo constante e pelas palavras amigas em alguns momentos difíceis. Obrigada pelo carinho!

Aos **amigos dos laboratórios da profa. Rosangela e da profa. Celuta** pela amizade, carinho e pelo aprendizado que tive com cada um de vocês. Agradeço pela oportunidade de fazer parte desta “família” e por poder compartilhar muitos momentos de alegria. Amigos como vocês jamais serão esquecidos. Muito obrigada!

Aos professores: **Rogério Gleiser, João Farinhas, Fátima, Rosana, Áurea Simone, Nena, Eduardo, Martha, Marcelo Costa, Bárbara, Vanessa, Andréa e Cláudia** pelos ensinamentos e incentivo. Muito Obrigada!

Às queridas amigas de turma **Cristiana, Lúcia Helena, Gláucia e Viviane**, por entrarem na minha vida e compartilharem comigo tantos momentos, alegres ou tristes. Agradeço pela amizade, carinho, preocupação e por compreenderem meus momentos de silêncio. Como já dizia Vinicius de Moraes: “Mesmo que as pessoas mudem e suas

vidas se reorganizem, os amigos devem ser amigos para sempre, mesmo que não tenham nada em comum”. Espero que nossa amizade seja eterna. Adoro vocês!

Às queridas amigas, **Senda e Fabiana** pelo companheirismo, compreensão e amizade por tantos anos. Amigas nossa amizade, com certeza será eterna, não importa a distância. Obrigada por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos da minha vida, deixando às vezes a suas vidas de lado. E, como não medimos esforços para manter nossa amizade sempre viva, apesar de alguns momentos turbulentos, dedico a vocês uma frase que é a nossa cara. “Todos querem o perfume das flores, mas poucos sujam as suas mãos para cultivá-las” (Augusto Cury). Espero que, juntas, possamos cultivar nossa amizade sempre.

Às queridas amigas **Roberta e Patrícia** pelo carinho e amizade e pela imensa colaboração no desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada!

Aos amigos de mestrado **Ana Carolina, Bárbara, Daniel, Érika, Patrícia Raquel e Senda** por compartilharem os momentos alegres e difíceis e pelo enorme carinho. Em especial a **Raquel** pelo total companheirismo e amizade, durante a execução deste trabalho.

Às queridas amigas **Fernanda, Beatriz, Livia, Lizandra, Camilla e Ana Cláudia** pela grande amizade e disponibilidade em me ajudar.

Às doutorandas **Roberta, Márcia, Luciana, Viviane, Carla, Andréa e Ana Karla** pelo carinho e incentivo.

Aos professores **Ronir Raggio Luis e Mônica**, pela grande ajuda nas análises estatísticas.

À profa. **Thais** pela enorme contribuição na realização da Microscopia.

Ao **Venício** pela disponibilidade e grande ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Ao **João** pela amizade e contribuição para a finalização deste trabalho.

Às queridas **Mary, Andréa, Gina e Kátia** pelo companheirismo durante os atendimentos na clínica e pelos vários momentos de alegrias proporcionados. Obrigada pela amizade!

Às queridas **Marília, Isabel, Bruna e Regina** pela amizade, carinho e bons momentos durante o nosso convívio.

À **Neide** por me acolher nos momentos difíceis e me transmitir calma e segurança. Obrigada!

Ao **Robson, Zezé, Luiza, Edinaldo e Jorge** pela amizade e momentos de descontração.

À **Natália, Bárbara e Beatriz**, companheiras do projeto SIDA/AIDS em Odontopediatria, por toda colaboração, paciência e dedicação. Muito obrigada!



À **equipe do ambulatório** pediátrico SIDA/AIDS – Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira (IPPMG), especialmente aos **Dr. Ricardo Hugo e Dra. Thalita**, pelos ensinamentos e disponibilidade

Aos **pequeninos pacientes** do IPPMG que fizeram parte deste trabalho e seus responsáveis, pela colaboração. Que Deus abençoe vocês!

À **Capes e CNPq**, que possibilitaram o desenvolvimento desta pesquisa.

A **todos os amigos** dedico a seguinte passagem de Charles Chaplin:

*“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha e não nos deixa só, porque deixa um pouco de si e leva um pouco de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso”.*

*“Se eu pudesse deixar algum presente à você, deixaria aceso o sentimento de amar a vida dos seres humanos.  
A consciência de aprender tudo o que foi ensinado pelo tempo a fora.  
Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais se repetissem.  
A capacidade de escolher novos rumos.  
Deixaria para você, se pudesse o respeito àquilo que é indispensável.  
Além do pão, o trabalho.  
Além do trabalho, a ação.  
E, quando tudo mais faltasse, um segredo:  
o de buscar no interior de si mesmo a resposta e a força para encontrar a saída”*

*Mahatma Gandhi*

## RESUMO

CHAGAS, Madeleine Souza das Chagas. **Prevalência de *Candida* spp. isoladas da mucosa bucal e de lesões cariosas cavitadas em dentina de crianças infectadas pelo HIV.** Rio de Janeiro, 2008. Dissertação (Mestrado em Odontologia, área de concentração em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

O objetivo foi analisar a prevalência de *Candida* spp. na cavidade bucal de crianças infectadas pelo HIV, antes e depois do tratamento odontológico, avaliar a atividade proteolítica de *C. albicans* assim como a presença desta levedura em lesões de cárie em dentina e investigar os possíveis fatores relacionados. Foram coletadas amostras da mucosa bucal (M) e lesões cariosas cavitadas ativas em dentina (CAD) de 30 crianças com diagnóstico definitivo para infecção pelo HIV, com idade entre 4 e 12 anos, seguida dos índices de cárie e informações sobre exames laboratoriais. As amostras foram semeadas em meio de cultura CHROMagar *Candida*<sup>®</sup> e as espécies identificadas através do sistema de assimilação e fermentação de açúcares (sistema API *Candida* 20C) e quantificadas na dentina cariada (D) e na mucosa bucal antes (M1) e depois (M2) do tratamento odontológico. Utilizou-se isolados de M e CAD de 23 pacientes, para analisar a atividade proteolítica de enzimas secretadas por *C. albicans*, utilizando como substrato protéico colágeno tipo I. Quatro molares decíduos extraídos foram seccionados longitudinalmente e utilizados para verificar a presença de *C. albicans* na dentina cariada, através da microscopia eletrônica de varredura (M.E.V.). Os dados foram analisados através do programa estatístico SPSS 13.0, utilizando Teste do Qui-quadrado, Wilcoxon, Mann-Whitney e correlação de Pearson. Foi observada uma diferença significativa entre o número de unidade formadora de colônias (UFC) em (M1) e (M2) ( $p < 0,05$ ). Verificou-se uma correlação positiva entre o número de lesões de cárie cavitadas (LCC) e (CAD) e o número de UFC em M1 ( $p < 0,05$ ). A *C. albicans* foi a espécie mais prevalente e sua atividade proteolítica foi observada em todos os isolados, sendo mais intensa nos isolados da dentina cariada ( $p < 0,05$ ). Em todos os fragmentos analisados no M.E.V. observou-se presença de *C. albicans* coagregada com bactérias. A carga viral, percentual de CD4 e uso de antiretrovirais com ou sem HARRT, não apresentaram associação com os resultados observados ( $p > 0,05$ ). A diminuição significativa no número de UFC em M2 indica que lesões de cárie em dentina podem servir de nicho para colonização e proliferação de espécies de *Candida*. Enzimas secretadas por *C. albicans* são capazes de degradar colágeno tipo I, o que provavelmente contribui para o surgimento de lesões cariosas, destacando a importância da implementação de programas de atenção à saúde bucal, principalmente em crianças infectadas pelo HIV.

**Palavras-chave:** *Candida* spp., cárie, criança, infecção pelo HIV, imunossupressão, enzimas proteolíticas, colágeno tipo I.

## ABSTRACT

CHAGAS, Madeleine Souza das Chagas. **Prevalência de *Candida* spp. isoladas da mucosa bucal e de lesões cáries cavitadas em dentina de crianças infectadas pelo HIV.** Rio de Janeiro, 2008. Dissertação (Mestrado em Odontologia, área de concentração em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

The objective was to analyze the prevalence of *Candida* spp. in the oral cavity of HIV-infected children, before and after the dental treatment, evaluate the proteolytic activity of *C. albicans* as well as the presence of this yeast in dentinal carious lesions and investigate the possible related factors. There were collected samples from the oral mucosa (M) and cavitated active dentinal carious (CAD) of 30 children with definitive diagnosis for HIV infection, aged between 4 and 12 years, followed by caries indexes and laboratorial exams information. The samples were cultured in CHROMagar *Candida*<sup>®</sup>, the isolates were identified by sugar assimilation and fermentation (API *Candida* 20C system) and then quantified in the decayed dentine (D) and oral mucosa before (M1) and after (M2) dental treatment. The isolates from M and CAD of 23 patients were used to analyze the proteolytic activity of enzymes secreted by *C. albicans*, using type I collagen as proteic substrate. Four extracted deciduous molars were longitudinally sectioned and used to check the presence of *C. albicans* in dentinal carious lesions, through the Scanning Electronic Microscopy (SEM). The data were analyzed through the statistical program SPSS 13.0, using the Qui-square, Wilcoxon and Mann-Whitney tests and Pearson correlation. A significant difference was observed between the number of colony-forming units (CFU) in M1 and M2 ( $p < 0.05$ ). The total number of cavitated carious lesions (CCL) and CAD were positively correlated with the number of CFU in M1 ( $p < 0.05$ ). *C. albicans* was the most prevalent species and its proteolytic activity was observed in all isolates, being greater in isolates from CAD ( $p < 0.05$ ). All dental fragments analyzed by S.E.M. presented *C. albicans* co-aggregated with oral bacteria. The viral load, percentage of CD4 and use of antiretroviral with or without HARRT, did not present association with the observed results ( $p > 0.05$ ). The significant reduction in the number of CFU in M2, indicates that dentinal carious lesions can serve as a niche for colonization and proliferation of *Candida* species. Enzymes secreted by *C. albicans* are able to degrade type I collagen, and can contribute to the appearance of carious injuries, showing the importance in implement of oral health programs, especially in HIV-infected children.

**Key words:** *Candida* spp., caries, child, HIV-infection, immunosuppression, proteolytic enzymes, type I collagen.

## LISTA DE FIGURAS

<b>ARTIGO 1</b> .....	<b>11</b>
<b>Graph 1.</b> Number of CFU for <i>Candida</i> spp. isolated from dentine (D) and oral mucosa before (M1) and after (M2) dental treatment of HIV-infected children (Wilcoxon test: a: p=0.045; b: p=0.049).....	31
<b>ARTIGO 2</b> .....	<b>32</b>
<b>Figure 1.</b> : Cleavage of soluble type I collagen by extracellular protease activities of <i>C. albicans</i> isolated from oral mucosa and dentinal caries isolates of HIV-infected children. A (control) – Type I collagen; B (oral mucosa) and E (dentine) – Type I collagen + <i>C. albicans</i> supernatant; C (oral mucosa) and F (dentine) – Type I collagen + <i>C. albicans</i> supernatant + PMSF; D (oral mucosa) and G (dentine) – <i>C. albicans</i> supernatant.....	48
<b>Figure 2:</b> Scanning electron microscopy (S.E.M.) showing <i>Candida</i> in dentinal carious lesions.....	48
<b>Graph 1.</b> Percentage of type I collagen degradation by <i>C. albicans</i> isolated from oral mucosa (M) and cavitated active dentinal caries (CAD) based on densitometry analysis of the degradation bands (Wilcoxon test, p=0.001) .....	49
<b>Graph 2:</b> Relation of percentage of type I collagen degradation by <i>C. albicans</i> isolated from oral mucosa with CD4 (a) and viral load (b). (Mann-Whitney test: a) p=0.386, b) p=0.275) .....	49
<b>Graph 3:</b> Relation of percentage of type I collagen degradation by <i>C. albicans</i> isolated from cavitated active dentinal caries (CAD) with CD4 (a) and viral load (b). (Mann-Whitney test: a) p=0.564, b) p=0.127) .....	50

## Lista de Tabelas

<b>ARTIGO 1</b> .....	<b>11</b>
<b>Table 1.</b> Growth classification of <i>Candida</i> spp. isolated from dentine (D) and oral mucosa before (M1) and after (M2) dental treatment of HIV-infected children (n=30).....	30
<b>Table 2.</b> <i>Candida</i> spp. isolated from dentine (D) and oral mucosa before (M1) and after (M2) dental treatment of HIV-infected children.....	30

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ART	Atraumatic Restorative Treatment
BHI	Brain Heart Infusion
CAD	Cavitated Active Dentinal Caries
CCL	Cavitated carious lesions
CD4	Linfócitos CD4
CDC	Centers for Disease Control
D	Dentine
GIC	Glass-ionomer cement
HAART	Highly Active Antiretroviral Therapy
HAART	Terapia Múltipla Combinada com Antiretrovirais e Inibidores de Proteases
HIV	Human Immunodeficiency Vírus
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
IgA	Imunoglobulina A
IPPMG	Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira
M	Oral mucosa
M1	Oral mucosa before dental treatment
M2	Oral mucosa after dental treatment
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
ml	mililitro
mM	miliMolar
n	number
OC	Oral candidiasis
Saps	Aspártico-proteases secretadas
SEM	Scanning Eletronic Microscopy
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
ZOE	Zinc oxide-eugenol cement
CFU	Colony-forming Units

**SUMÁRIO**

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>6</b>
<b>3.</b>	<b>DELINEAMENTO DA PESQUISA .....</b>	<b>8</b>
<b>4.</b>	<b>ARTIGOS SUBMETIDOS .....</b>	<b>10</b>
<b>4.1</b>	<b>Artigo 1 .....</b>	<b>11</b>
<b>4.2</b>	<b>Artigo 2 .....</b>	<b>32</b>
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>58</b>
	<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>59</b>

**ANEXOS**



## 1. INTRODUÇÃO

A infecção pelo HIV foi descrita pela primeira vez em crianças em 1983 e, apesar de apresentar muitas similaridades com a infecção em adultos, existem inúmeras diferenças tais como: vias de transmissão, fatores de risco, padrão de soroconversão e manifestações bucais (SANTOS *et al.*, 2001). Atualmente, das 33,2 milhões de pessoas infectadas pelo HIV, em todo o mundo, 2,5 milhões são crianças (UNAIDS, 2007).

A principal via de transmissão é a vertical, presente em 85% dos casos pediátricos nos EUA e no mundo (CHIGURUPATI *et al.*, 1996; NAIDOO & CHIKTE, 2004; SOARES *et al.*, 2004), podendo ocorrer durante a gestação ou durante ou após o parto, através da amamentação natural (CHIGURUPATI *et al.*, 1996).

As manifestações bucais têm sido relatadas como sendo os primeiros indicadores da infecção pelo HIV (NAIDOO & CHIKTE, 2004; COOGAN *et al.*, 2005; HODGSON *et al.*, 2006b), estando diretamente relacionadas com o grau de imunossupressão do paciente, representada pela diminuição no número de linfócitos CD4 (CHIGURUPATI *et al.*, 1996; COOGAN *et al.*, 2005; HODGSON *et al.*, 2006b; MIZIARA *et al.*, 2006) e aumento da carga viral (COOGAN *et al.*, 2005; CHALLACOMBE *et al.*, 2006), uso de medicamentos e hábitos de higiene bucal (KREDPON *et al.*, 2004). As lesões bucais associadas à infecção pelo HIV encontradas com maior frequência em pacientes pediátricos são: candidíase bucal, estomatite herpética, eritema linear gengival, hipertrofia das parótidas e úlceras aftosas (LEGGOTT *et al.*, 1992; CHIGURUPATI *et al.*, 1996; RAMOS-GOMEZ *et al.*, 1999; SOARES *et al.*, 2004; FREZZINI *et al.*, 2005). No caso dos adultos, além da candidíase bucal, existem outras lesões fortemente associadas à infecção: Sarcoma

de Kaposi, Linfoma não-Hodgkin e Leucoplasia Pilosa, sendo estas mais raras em crianças (RAMOS-GOMEZ *et al.*, 1999; COOGAN *et al.*, 2005; FREZZINI *et al.*, 2005; HODGSON *et al.*, 2006b).

A candidíase bucal é a lesão mais comum em pacientes infectados pelo HIV, podendo ser considerada a primeira manifestação bucal clinicamente observável da doença, possuindo alto valor preditivo para evolução da mesma (JABRA-RIZK *et al.*, 2000; PONGSIRIWET *et al.*, 2004; FREZZINI *et al.*, 2005; CHALLACOMBE *et al.*, 2006; HODGSON *et al.*, 2006a; CERQUEIRA *et al.*, 2007). Sua prevalência varia entre 20 e 83,3% nos pacientes pediátricos infectados pelo HIV (CHIGURUPATI *et al.*, 1996; RAMOS-GOMEZ *et al.*, 1999; SANTOS *et al.*, 2001; NAIDOO & CHIKTE, 2004; FREZZINI *et al.*, 2005), e entre 1,5 e 56% nos adultos infectados (KERDPON *et al.*, 2004; FREZZINI *et al.*, 2005).

A *Candida albicans* é o agente etiológico encontrado com maior frequência em lesões de candidíase bucal (SEN *et al.*, 1997; PORTELA *et al.*, 2004; CERQUEIRA *et al.*, 2007), ocorrendo como um microrganismo comensal na cavidade bucal dos indivíduos, sem causar alterações (ARENDORF & WALKER, 1980; DOUGLAS *et al.*, 1988; NAGLIK *et al.*, 2003; PONGSIRIWET *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2006), entretanto, em pacientes imunocomprometidos ela assume características de patogenicidade alterando a harmonia com o hospedeiro (SWEET, 1997; STARR *et al.*, 2002; NAGLIK *et al.*, 2003; PONGSIRIWET *et al.*, 2004).

Estudos relatam que outras espécies de *Candida* também vêm emergindo como patógenos causadores de infecções fúngicas como *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* (BOSCO *et al.*, 2003) e *C. dubliniensis* (JABRA-RIZK *et al.*, 2000; PORTELA *et al.*, 2004; FREZZINI *et al.*, 2005).

Alguns fatores são considerados predisponentes para o desenvolvimento da candidíase bucal dentre eles destacam-se deficiência de ácido fólico e ferro, uso de antibióticos de amplo espectro por tempo prolongado (SCHEUTZ *et al.*, 1997; SWEET *et al.*, 1997), xerostomia (SWEET *et al.*, 1997; JACOB *et al.*, 1998) higiene bucal deficiente, dieta rica em carboidratos (JACOB *et al.*, 1998; LIU *et al.*, 2006) e deficiências do sistema imune, estando muitos destes presentes em pacientes infectados pelo HIV (SANTOS *et al.*, 2001; STARR *et al.*, 2002; PORTELA *et al.*, 2004; FREZZINI *et al.*, 2005).

As espécies de *Candida* apresentam vários fatores de virulência, dentre eles dimorfismo, variação antigênica, imunomodulação dos mecanismos de defesa do hospedeiro (SWEET, 1997; NIKAWA *et al.*, 2003), adesinas e proteases secretadas (SWEET, 1997; NAGLIK *et al.*, 2003; NIKAWA *et al.*, 2003; PONGSIRIWET *et al.*, 2004). As proteases secretadas são as enzimas hidrolíticas que estão mais associadas à virulência do microrganismo, sendo divididas em quatro classes: serina, cisteína, aspártico-proteases e metaloproteases (NAGLIK *et al.*, 2003).

As aspártico-proteases secretadas (Saps) têm despertado grande interesse, pois desempenham importante papel na patogênese da candidíase (OLLERT *et al.*, 1995; ZEPPELIN *et al.*, 1999; BOSCO *et al.*, 2003). Elas são capazes de atuar em diferentes níveis de pH (entre 2,0 e 7,0), promovendo condições favoráveis para adesão, colonização e desenvolvimento de espécies de *Candida*, facilitando sua proliferação, através da degradação de proteínas salivares como mucina e IgA (NAGLIK *et al.*, 2003). Além disso, uma maior produção de proteases por espécies de *Candida* isoladas de pacientes infectados pelo HIV, comparando-se aos soronegativos, tem sido relatada (OLLERT *et al.*, 1995; BOSCO *et al.*, 2003; COSTA *et al.*, 2003).

Estudos apontam que a terapia antiretroviral combinada com drogas inibidoras de proteases (Highly Active Antiretroviral Therapy – HAART) parece possuir um efeito indireto sobre as lesões bucais, principalmente a candidíase, diminuindo a prevalência das mesmas (FREZZINI *et al.*, 2005; HODGSON *et al.*, 2006a; YANG *et al.*, 2006). Além de possibilitar melhora das funções imunológicas do paciente com aumento dos níveis de linfócitos CD4, tornando-os menos susceptíveis às infecções oportunistas (EYESON *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2001; NICOLATOU-GALITIS *et al.*, 2004; FREZZINI *et al.*, 2005), os inibidores de proteases podem funcionar como agentes antifúngicos, pois atuam também nas aspártico-proteases secretadas (Saps), a classe de protease expressa por espécies de *Candida* spp., envolvida nos processos de adesão e penetração na célula do hospedeiro (ZEPPELIN *et al.*, 1999; BARCHIESI *et al.*, 2002; CASSONE *et al.*, 2002; HODGSON *et al.*, 2006a).

Crianças infectadas pelo HIV apresentam também uma alta e maior prevalência de cárie quando comparadas às não-infectadas (MADIGAN *et al.*, 1996; CASTRO *et al.*, 2004; HODGSON *et al.*, 2006b; CERQUEIRA *et al.*, 2007), sendo esta possivelmente resultante de uma dieta hipercalórica, alto teor de sacarose presente nos medicamentos, diminuição do fluxo salivar, imunossupressão devido à progressão da infecção pelo HIV e higiene bucal deficiente (ELDRIDGE & GALLAGHER, 2000; CASTRO *et al.*, 2004; FREZZINI *et al.*, 2005).

Alguns autores demonstraram que a presença de lesões cariosas em dentina de pacientes infectados pelo HIV pode servir de nicho para colonização e proliferação de espécies de *Candida* (JACOB *et al.*, 1998; SZIEGOLEIT *et al.* 1999; STARR *et al.*, 2002; HOSSAIN *et al.* 2003; REGO *et al.* 2003). Cerqueira *et al.* (2007) em um estudo comparativo entre crianças infectadas pelo HIV e crianças

saudáveis, relataram uma elevada prevalência de espécies de *Candida* na dentina cariada dos dois grupos, observando ainda uma maior prevalência nas crianças infectadas. Em outro estudo com crianças brasileiras, Rego e colaboradores (2003) verificaram uma diminuição na prevalência de *Candida*, após o tratamento dentário com óxido de zinco e eugenol (70%) e cimento ionômero de vidro (46%), o que corrobora os achados de Sziegoleit *et al.* (1999), demonstrando a importância do tratamento odontológico no controle da colonização de *Candida* spp. na cavidade bucal.

As enzimas proteolíticas secretadas por *Candida* são capazes de degradar colágeno (KAMINISHI *et al.*, 1986; SCHALLER *et al.*, 2005), principalmente o tipo I (RODIER *et al.*, 1999; IMBERT *et al.*, 2002), que constitui mais de 90% da matriz orgânica dentinária (BERKOVITZ *et al.*, 2004; PIESCO *et al.*, 2005). Além disso, alguns autores relatam que a *C. albicans* é capaz de coagregar-se com bactérias existentes na cavidade bucal, favorecendo sua adesão à mucosa bucal e estrutura dentária (JENKINSON *et al.*, 1990; GRIMAUDO *et al.*, 1996). Com isso, são criadas condições favoráveis para colonização e proliferação deste microrganismo, o que pode acelerar o processo cariioso. (MORSCHHÄUSER *et al.*, 1997; NAGLIK *et al.*, 2004; MARDEGAN *et al.*, 2006).

Ressalta-se, portanto a necessidade de adotar medidas preventivas e de atenção à saúde bucal nas crianças infectadas pelo HIV, com o objetivo de eliminar os nichos para esses fungos e, conseqüentemente, diminuir o risco para o desenvolvimento de candidíase bucal, oferecendo uma melhor qualidade de vida para estes pacientes.

## **2. PROPOSIÇÃO**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Determinar a prevalência de diferentes espécies de *Candida* isoladas da mucosa bucal e de lesões cariosas cavitadas ativas em dentina de pacientes pediátricos infectados pelo HIV.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

2.2.1 Quantificar e identificar as espécies de *Candida* isoladas da mucosa bucal e de lesões cariosas cavitadas ativas em dentina de crianças infectadas pelo HIV.

2.2.2 Relacionar o número de unidades formadoras de colônias (UFC)/ml e de espécies de *Candida* isoladas de crianças infectadas pelo HIV com o percentual de linfócitos CD4, carga viral e uso de medicação antiretroviral.

2.2.3 Relacionar o número de UFC/ml e de espécies de *Candida* encontradas com o número de lesões cariosas cavitadas ativas em dentina de crianças infectadas pelo HIV.

2.2.4 Avaliar o efeito do tratamento odontológico (Tratamento Restaurador Atraumático e exodontias) na prevalência de espécies de *Candida*, isoladas da mucosa bucal, em crianças infectadas pelo HIV.

2.2.5 Analisar o perfil de colonização de espécies de *Candida* em lesões de cárie em dentina de elementos dentários, com indicação para exodontia, de crianças infectadas pelo HIV, através da Microscopia Eletrônica de Varredura (M.E.V.)

2.2.6 Analisar a atividade proteolítica das espécies de *Candida* isoladas da mucosa bucal e de lesões cariosas cavitadas ativas em dentina de crianças infectadas

pelo HIV, utilizando colágeno tipo I como substrato protéico, e identificar a classe de enzimas atuante.

### **3. DELINEAMENTO DA PESQUISA**

O presente estudo foi caracterizado como de intervenção e comparativo, ao propor uma análise comparativa da prevalência de espécies de *Candida* isoladas da mucosa bucal e de lesões cariosas cavitadas ativas em dentina de pacientes pediátricos infectados pelo HIV, antes e após o tratamento odontológico.

O estudo teve seu início após a aprovação pelo Comitê de Ética local do IPPMG (Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, na cidade do Rio de Janeiro, Brasil (Anexo 1, pg. 62).

A população estudada foi constituída por pacientes infantis com diagnóstico definitivo para a infecção pelo HIV, que fazem parte do Serviço de AIDS Pediátrica do IPPMG e acompanhados pelo Projeto SIDA/AIDS em Odontopediatria (Faculdade de Odontologia – UFRJ). A seleção da amostra foi feita por conveniência, examinando-se as crianças que compareciam para atendimento médico durante um período de 09 meses (Setembro de 2006 a Maio de 2007). Após a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, devidamente explicado e assinado pelo responsável legal da criança e anuência da mesma (Anexo 2, pg. 63), a amostra final foi constituída por 30 crianças na faixa etária de 4 a 12 anos de idade.

Os dados sobre os exames intra e extraoral foram anotados nas fichas de cada paciente (Anexo 3, pg. 64), enquanto que a história médica (classificação clínica e imunológica da doença, tipo de transmissão, uso de medicamentos antiretrovirais) e os exames laboratoriais (carga viral, percentual e contagem de CD4) mais recentes, colhidos até 03 meses antes ou após o exame bucal, foram obtidos dos prontuários médicos de cada paciente.



Visando concretizar os objetivos da presente pesquisa, foram elaborados dois artigos científicos descrevendo a metodologia empregada e os resultados obtidos.

No artigo 1 identificou-se e quantificou-se as espécies de *Candida* encontradas na mucosa bucal e dentina cariada, verificando sua relação com o percentual de CD4, carga viral, uso de antiretrovirais e número de lesões cariosas ativas em dentina nas crianças infectadas pelo HIV. Também descreve os resultados sobre a prevalência de *Candida* spp. na mucosa bucal antes e depois do tratamento odontológico.

O artigo 2 analisou a capacidade de degradação de colágeno tipo I por enzimas secretadas por *C. albicans*, isolada da mucosa bucal e lesões cariosas cavitadas ativas em dentina de crianças infectadas pelo HIV assim como identificou a classe de enzima atuante na degradação e verificou a presença desta levedura em lesões cariosas cavitadas ativas em dentina, destes pacientes, através da microscopia eletrônica de varredura (M.E.V.)

## **4. ARTIGOS SUBMETIDOS**

**Artigo 1 - “Effect of dental treatment on *Candida* spp. colonization in HIV-infected children”, submetido.**

**Artigo 2 - “Proteolytic activity of *Candida albicans* isolated from oral mucosa and dentinal carious lesions of HIV-infected children”, a ser submetido.**

## 4.1 Artigo 1

### Effect of Dental Treatment on *Candida* spp. Colonization in HIV-Infected Children

**Running title: Dental treatment efficacy on *Candida* spp. colonization**

Madeleine Souza das Chagas<sup>1</sup>, Rosangela Maria Soares<sup>2</sup>, Daniella Ferraz Cerqueira<sup>3</sup>, Ivete Pomarico Ribeiro de Souza<sup>1</sup>, Maristela Barbosa Portela<sup>1</sup>, Gloria Fernanda Castro<sup>1\*</sup>.

Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil<sup>1</sup>; Institute of Microbiology, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil<sup>2</sup>; Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, University of São Paulo, Brazil<sup>3</sup>.

**\*Corresponding author. Mainly address:**

Dr. Gloria Fernanda Castro – Rua José Veríssimo, 36/207, Méier, Rio de Janeiro, RJ  
- Brazil Zip Code: 20720-180  
Tel.: +55-21-39799820  
Fax: +55-21-25622098  
e-mail: gfbacastro@yahoo.com.br

**ABSTRACT**

The study analyzed the effect of dental treatment on the prevalence of *Candida* spp. in oral mucosa of HIV-infected children. And also investigate the relationship with both cavitated active dentinal caries (CAD) and predisposing factors, such as percentage of CD4, viral load and use of antiretroviral therapy. Thirty HIV-infected children aged between 4 and 12 years were selected for this study. After performing dental and clinical examination, the specimens were collected from oral mucosa (M) and CAD by using swab and dental curette, respectively. Then dental treatment was performed and after another collect of oral mucosa was made. Statistical analyses based on Chi-square ( $\chi^2$ ), Wilcoxon and Mann-Whitney tests and Pearson correlation were performed by using SPSS 13.0 software. Regarding the mean of colony-forming units (CFU) values, significant differences were observed between the presence of *Candida* in dentine (D) and in oral mucosa before dental treatment (M1), as such as between M1 and oral mucosa after dental treatment (M2) ( $p < 0.05$ , Wilcoxon test). The total number of cavitated carious lesions (CCL) and number of CAD were positively correlated with the number of CFU in M1 ( $p < 0.05$ , Pearson correlation). *Candida albicans* was the most prevalent species. Viral load, percentage of CD4 and use of antiretroviral, including HAART, had no association with prevalence of yeasts ( $p > 0.05$ , Mann-Whitney test). The decrease in CFU values in M2 indicates that dentinal carious lesions can serve as a niche for colonization and proliferation of *Candida* species, thus demonstrating that the dental treatment becomes crucially for controlling this fungus.

**Key-words:** *Candida* spp., caries, paediatric AIDS, immunosuppression.

## INTRODUCTION

Oral candidiasis (OC) is the most common lesion seen in HIV-infected children and also represents a highly reliable indicator of immunosuppression associated with AIDS evolution (4, 33). *Candida albicans* is the most frequently etiological agent found in OC (10, 34). However other species such as *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. guillermondii* (10) and *C. dubliniensis* (18, 34) have been emerging as pathogenic agents causing fungal infections.

Some predisposing factors may influence the development of OC as antibiotic therapy (41), xerostomy (19), poor oral hygiene (3), increase intake of carbohydrates (19) and immune deficiency diseases, such as a decreased number of CD4 lymphocytes (21, 25, 37). Most of these factors are seen in HIV-infected individuals, particularly in children (10, 25, 34). Besides these, the prolonged use of medication containing high sucrose concentration may be accounted for the fact that HIV-infected children have a higher prevalence of caries compared to non-infected children (7, 14, 26).

Some authors have demonstrated that the presence of carious lesions in dentine can promote both colonization and proliferation of *Candida* species (16, 19, 35, 42). Carvalho et al. (5) found, in a group of children, a high prevalence of *C. albicans* in dentinal caries. In other study, Cerqueira et al. (9) have noted that HIV-infected children who had positive growth for *Candida* spp. also had a greater number of dentinal carious lesions, which seems to be another risk factor for oral colonization by *Candida* species and development of OC in these patients.

Studies have also observed a decrease in the prevalence of *Candida* after dental treatment (40, 42). For instance, Rego et al. (35) showed that children who received dental restorative treatment with zinc oxide-eugenol cement (ZOE) and glass-ionomer cement (GIC) had a greater reduction in the prevalence of *Candida*

spp. (70 and 46%, respectively) thus demonstrating the importance of dental treatment to control the *Candida* colonization in the oral cavity.

Therefore, the present study aimed to determine the prevalence of *Candida* spp. in oral mucosa before and after dental treatment, presence of this yeast in dentine of active dentinal caries lesions and in addition to observing its possible relationship with CD4, viral load, antiretroviral therapy and presence of dental caries in HIV-infected children.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Subjects**

The study group consisted of 30 HIV-infected children, selected by convenience during a period of nine months, aged between 4 and 12 years, all from a Pediatric AIDS Outpatients Clinic from a public hospital (Rio de Janeiro, Brazil) and followed up at the Child Dentistry School through the SIDA/AIDS Project.

Children had definitive diagnosis for HIV infection confirmed by ELISA and Western Blot tests. In addition, they had to present 1-5 cavitated active dentinal carious lesions, at least 1 tooth being accessible to n°5 curette (Duflex®), and they could not be under antifungal therapy nor taking topical antimicrobial medication for at least 3 months prior to material collection.

All data regarding to children's personal information, medical recent history and laboratory exams (percentage of CD4 and viral load) were obtained from their respective medical records.

This study had the Ethics Committee Approval and informed consents were obtained from all children's legal guardians.

### **Sample collection**

The collection of clinical specimens was performed by a single trained examiner, after supervised tooth-brushing and visual exam of the oral cavity for presence of carious lesions (including white spots) and soft tissue lesions. For statistical analysis it was considered the total number of cavitated carious lesions (CCL) and cavitated active dentinal caries (CAD). CAD was classified if their aspects were moist, soft and yellow in color (23).

The material from oral mucosa was obtained by using a sterile swab, which was rubbed three times against the tongue's dorsal surface, jugal mucosa, and hard palate. Next, the swab was put into a sterilized test tubes containing 1 ml of saline solution (0.85% NaCl).

The dentine from CAD was collected by using a n°5 sterile dentinal curette (Duflex<sup>®</sup>) as follows: after removing the external layer of the dentinal carious lesion, three parts of inner layer and core dentine were obtained and then put into sterile *ependorffs* tubes of 1.5 ml, which had been previously weighted. Only one tooth had its dentine collected, but in those cases where the patient had more than 1 tooth with CAD, the specimen to be collected was that from the tooth presenting the most extensive lesion. All samples were kept under refrigeration for laboratorial procedures within 2 hours.

Following the specimen collection, all the teeth had their caries-infected enamel and dentine tissues completely removed and then restored with glass-ionomer cement (VitroMolar<sup>®</sup>, DFL) according to the steps recommended by the Atraumatic Restorative Treatment (ART) (13). Also, fluoride application (1.23% sodium fluoride) was topically performed and those patients requiring other dental needs were referred to the Child Dentistry School for such a procedure. Two weeks

after the finishing dental treatment (42), another material was collected from the oral mucosa according to criteria describe above.

### **Microbiological Analysis**

The *eppendorffs* tubes containing the dentine specimens were weighted and then 1 ml of sterile saline solution (0.85% NaCl) was put inside them before seeding.

In order to quantify and identify the specimens, the test tubes containing swabs and the *eppendorffs* tubes containing dentine specimens were vortexed for 30 seconds to release the cells adhered to swab (2) and to homogenize the suspension with dentinal caries (42). After, 100  $\mu$ L of each solution were seeded in plates with a chromogenic agar (CHROMagar *Candida*<sup>®</sup>) incubated at 37°C for 48-72 hours, which allows a presumptive identification of *Candida* spp. through the color of each colony formed (30).

With regard to the growth of *Candida* colonies, those growing from oral mucosa specimens were classified as mild (<10 CFU/ml), moderate (11-49 CFU/ml) or strong (>50 CFU/ml) according to LAMEY et al. (24), whereas those growing from dentinal caries specimens were classified as absent (0 colonies), very sparce (< 10 colonies), sparce (10-10<sup>2</sup> colonies), moderate (10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup> colonies) or numerous (> 10<sup>3</sup> colonies) according to HOSSAIN et al. (16).

Colonies with different colors were analyzed by using biochemical tests for sugar assimilation and fermentation according to API *Candida* 20C system (Biomerieux, Marcy L'Etoile, France), thus allowing *Candida* species to be definitively identified (Anexo 4, pg. 68).



## Statistical Analysis

Data were analyzed based on Chi-square ( $\chi^2$ ), Wilcoxon and Mann-Whitney tests, and Pearson's correlation by using SPSS 13.0 software, at significance level of 5%.

## RESULTS

A total of 30 children were selected for study, with mean age of 8.07 years (S.D.: 2.36), and 17 of them were boys (56.7%). According to CDC criteria (1994), thirteen (43.3%) patients had no immunosuppression, thirteen (43.3%) had moderate immunosuppression and four (3.4%) had severe immunosuppression. Nineteen (63.3%) patients presents moderate viral load and 9 (30%) indetectable viral load. The great majority (n = 21, 70%) of the patients received antiretroviral therapy, and 16 of these (76.2%) were under highly active antiretroviral therapy (HAART).

With regard to the growth of *Candida* species, 24 patients (80%) were positive for dentine (D), with 11 (36.7%) presenting numerous growth. In addition, 26 (86.7%) patients had positive growth in oral mucosa before dental treatment (M1), most having strong growth (n=11, 36.7%). After dental treatment (M2) 19 (63.3%) patients had positive growth being the majority with moderate growth (n=8; 26.6%), although no significant difference was observed between M1 and M2 ( $\chi^2$ , p=0.065) (Table 1).

The mean number of colony-forming units (CFU) was found to be significantly greater in D ( $140.6 \pm 235.46$ ) compared to M1 ( $55.8 \pm 90.3$ ) (Wilcoxon test: p=0.049). The difference between number of CFU in M1 and M2 ( $36.1 \pm 78.2$ ) was also statistically significant (Wilcoxon test: p=0.045), thus showing a decrease in *Candida* prevalence after dental treatment (Graph 1). Considering the 26 patients with positive

growth in M1, five had an increase in CFU and 21 a decrease, including 9 cases with total reduction. In addition, two patients that had no *Candida* in M1 showed positive growth in oral mucosa after dental treatment.

Among *Candida* species found in the present study, *C. albicans* was the most prevalent, present in all patients who had positive growth in dentine (24) and M1 (26), and in 18 (95%) patients in M2 (Table 2). No statistically significant difference was observed in the CFU values for *C. albicans* between M1 and M2 (Wilcoxon test:  $p=0.067$ ). Before dental treatment, three patients had concomitant growth of *C. albicans* and *C. tropicalis* in D and M1. After the dental treatment, mixed cultures were found in two patients, being one with concomitant growth of *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* and other with *C. albicans* and *C. parapsilosis*. *Candida* species are listed in Table 2.

By correlating the total number of cavitated carious lesions (CCL) and number of cavitated active dentinal caries (CAD) with the number of CFUs at M1, a significant result was observed ( $p=0.012$  and  $p=0.040$ , respectively). It was also verified positive correlation between CCL and CAD with the number of CFUs for *C. albicans* before dental treatment ( $p=0.015$  and  $p=0.048$ , respectively) (Pearson's correlation).

When the relation of percentage of CD4, viral load, antiretroviral therapy, and HAART with the number of CFUs were analysed, no statistically significant result was found (Mann-Whitney test:  $p>0.05$ ).

## **DISCUSSION**

Colonization of oral cavity by *Candida* spp. occurs through commensalism (16, 25, 33) however in patients presenting immunosuppression, the harmony with the host is changed and colonization is more frequently seen and may become

pathogenic (33, 40), thus increasing the risk of clinical lesions. In addition, the presence of carious lesions raises this risk because they can serve as a niche for microorganism proliferation (9, 35), particularly in HIV-infected patients, which makes dental treatment imperative in these patients.

The results of the present study showed that the majority of HIV-infected children had been positive for *Candida* species in their dentine (D) (80%) and oral mucosa before dental treatment (M1) (86.7%), thus corroborating the finding by Sziegoleit et al. (42), who reported the presence of this yeasts in saliva of 66.7% patients before dental treatment and in 81.5% of caries specimens. According to these authors, *Candida* colonization in saliva is related to high levels of such species in caries lesions, and this could explain the high predominance of *Candida* species at M1 in the present study. Moreover, the number of CFU in dentine were statistically higher than in M1 ( $p < 0.05$ ), a similar finding observed by Hossain et al. (16), who reported more CFU in carious lesions than in saliva.

Cerqueira et al. (9) have found a significant correlation between the number of carious teeth and *Candida* CFU in saliva. The present study also found similar correlation between the total number of cavitated caries lesions and number of cavitated active dentinal caries with CFU in the oral mucosa before dental treatment ( $p < 0.05$ ). As related before, cavitated caries lesions can function as a retentive site for *Candida* spp. (9, 35). When dentinal caries are present, this retention could be increased because of the presence of the type I collagen which is degraded by proteolytic enzymes secreted by these yeast (17, 36).

Studies have shown a decrease in the prevalence of *Candida* following dental treatment (35, 40, 42). Similar results were also observed as the number of CFU in oral mucosa after dental treatment (M2) was statistically lower compared to M1

( $p < 0.05$ ). In a study with Brazilian children, Rego et al. (35) after dental treatment using ZOE and GIC also verified a reduction in CFU (70% and 46% respectively), and considered that these findings are related with a decrease in the number of niches for *Candida* colonization as well as described by HOSSAIN et al. (16) and JACOB et al. (19).

Some authors related that treatment with ZOE can produce an antifungal effect on *Candida* spp. (15), and it could be more effective than GIC for reducing the number of CFU in oral cavity (6, 35). He et al. (15) observed, *in vitro*, that the eugenol reduced *C. albicans* biofilm's formation by modifying the yeasts and its adhesion capacity.

Otherwise, HOSSAIN et al. (16) have reported that glass-ionomer cement has an antimicrobial effect on *Candida* species due to fluoride release. Sodium fluoride can influence the ecto-phosphatase activity of such microorganisms according to Kiffer-Moreira et al. (22) that found a reduction in *Candida* adhesion to epithelial cells in the presence of this compound. In the present study, GIC was the restorative cement chosen for dental treatment because of its fluoride-releasing capacity, which is also an important aspect for preventing carious lesions and it can be used as a definitive restorative material. Therefore, this therapeutic approach seems to be very useful for these HIV-infected patients, who have highly caloric diet and take medications containing high sucrose concentration.

*Candida albicans* is the most predominant species observed before and after dental treatment corroborating the results obtained by Sziegoleit et al. (42) e Rego et al. (35). This yeast can secrete proteolytic enzymes that are important for their pathogenesis, which allows this fungus to adapt to environmental changes (29). In addition, such this enzymes can degrade the collagen (4, 38), particularly the type I

one (17, 20, 36), which represents more than 90% of the dentine organic matrix (1, 32). As a result colonization and proliferation regarding *C. albicans* become facilitated as well (27-29), which helps promote the caries process in dentine. Furthermore, it has been reported that certain *Candida* species isolated from HIV-infected patients can produce more proteases than those found in HIV-negative patients (4, 12, 31).

Other *Candida* species, such as *C. tropicalis* and *C. parapsilosis*, were also found in the present study. According to Naglik et al. (29), these both are the most virulent non-*albicans* species after *C. albicans* and they can secrete a great amount of protease. Their presence in the isolates analysed in this study can be explained by the instability of oral microbiota in children, where *Candida* colonization still transitory (39).

As similar to Costa et al. (11), the present work found no association between percentage of CD4, viral load and antiretroviral therapy with or without HAART and *Candida* CFU isolated from oral mucosa. These results could be explained by the fact that the majority of patients had their immunosuppression controlled during the present study, presenting moderate or even no immunosuppression.

The present results showed that dental treatment is effective in reducing the prevalence of *Candida* spp. in oral cavity, since no other variable was found to be statistically significant related to this reduction. Therefore, one can speculate that dental treatment itself could be accounted for such a reduction, particularly when glass-ionomer cement is used, which promote fluoride release, helping the control and prevention of carious lesions and oral colonization of *Candida* species in HIV-infected children. It is important to emphasize that a multidisciplinary team should follow up such patients, including the pediatric dentistry. Appointments should be periodically made in order to eliminate within others predisposing factors, niches of

fungi proliferation through dental treatment, instruction on oral hygiene, and diet counseling, increasing quality of life in HIV-infected patients.

## REFERENCES

1. **Berkovitz, B. K. B., G. R. Holland, and B. J. Moxhan.** 2004. Dentina. *In:* Berkovitz, B. K. B., G. R. Holland, and B. J. Moxhan. Anatomia, embriologia e histologia bucal, 3rd ed., Porto Alegre, RS, Brasil.
2. **Berkowitz, R., G. Obeid, L. McIlveen, P. Geston, C. Mohla, and J. Campos.** 1994. Comparison of two sampling techniques for quantitation of oral yeasts levels. *Pediatr. Dent.*, **16**:62-63.
3. **Blignaut, E.** 2007. Oral candidiasis and oral yeast carriage among institutionalized South African paediatric HIV / AIDS patients. *Mycopathologia*, **163**:67-73.
4. **Bosco, V. L., E. G. Birman, A. E. Cury, and C. R. Paula.** 2003. Yeasts from the oral cavity of children with AIDS: exoenzyme production and antifungal resistance. *Pesq. Odontol. Bras.*, **17**:217-222.
5. **Carvalho, F. G., D. S. Silva, J. Hebling, L. C. Spolidoro, and D. M. Spolidoro.** 2006. Presence of mutans streptococci and *Candida* spp. in dental plaque / dentine of carious teeth and early childhood caries. *Arch. Oral Biol.*, **51**:1024-1028.
6. **Cassanho, A. C. A., A. M. Fernandes, L. D. Oliveira, C. A. T. Carvalho, A. O. C. Jorge, and C. Y. Koga-Ito.** 2005. *In vitro* activity of zinc oxide-eugenol and glass ionomer cements on *Candida albicans*. *Braz. Oral Res.*, **19**:134-138.
7. **Castro, G. F., I. P. R. Souza, S. Lopes, P. Stashenko, and R. P. Teles.** 2004. Salivary IgA to cariogenic bacteria in HIV-positive children and its correlation

with caries prevalence and levels of cariogenic microorganisms. *Oral Microbiol. Immunol.*, **19**: 281-288.

8. **Center for Disease Control and Prevention** – 1994. Revised classification system for human immunodeficiency virus infection in children less than 13 years of age. *MMWR*, **43**:1-10.
9. **Cerqueira, D. F., M. B. Portela, L. Pomarico, R. M. A. Soares, I. P. R. Souza, and G. F. Castro.** 2007. Dentinal carious lesions: A predisposing factor for the oral prevalence of *Candida* ssp. in HIV-infected children. *ASDC J. Dent. Child.*, **74**:98-103.
10. **Chattopadhyay, A., D. J. Caplan, G. D. Slade, D. C. Shugars, H-C. Tien, and L. L. Patton.** 2005. Risk indicators for oral candidiasis and oral hairy leukoplakia in HIV-infected adults. *Community Dent. Oral Epidemiol.*, **33**:35-44.
11. **Costa, C. R., A. J. Cohen, O. F. L. Fernandes, K. C. Miranda, X. S. Passos, L. K. H. Souza, and M. R. R. Silva.** 2006. Asymptomatic oral carriage of *Candida* species in HIV-infected patients in the Highly Active Antiretroviral Therapy era. *Rev. Inst. Med. Trop.*, **48**:257-261.
12. **Costa, E. M. M. B., A. L. S. Santos, A. S. Cardoso, M. B. Portela, C. M. Abreu, C. S. Alvino, A. N. Hagler, and R. M. A. Soares.** 2003. Heterogeneity of metallo and serine extracellular proteases in oral clinical isolates of *Candida albicans* in HIV-positive and healthy children from Rio de Janeiro. *FEMS Immunol. Méd. Microbiol.*, **38**:173-180.
13. **Frencken, J. E., and C. J. Holmgren.** 2001. Tratamento Restaurador Atraumático (ART) para a Cárie Dentária, 1th ed., São Paulo, SP, Brasil.



14. **Frezzini, C., J. C. Leão, and S. Porter.** 2005. Current trends of HIV disease of the mouth. *J. Oral Pathol. Med.*, **34**:513-531.
15. **He, M., M. Du, M. Fan, and Z. Bian.** 2007. In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia*, **163**:137-143.
16. **Hossain, H., F. Ansari, N. Schulz-Weidner, W-E. Wetzel, T. Chakraborty, and E. Domann.** 2003. Clonal identity of *Candida albicans* in the oral cavity and the gastrointestinal tract of pre-school children. *Oral Microbiol. Immun.*, **18**:302-308.
17. **Imbert, C., C. Kauffmann-Lacroix, G. Daniault, J. L. Jacquemin, and M. H. Rodier.** 2002. Effect of matrix metalloprotease inhibitors on the 95 kDa metallopeptidase of *Candida albicans*. *J. Antimicrobiol. Chem.*, **49**:1007-1010.
18. **Jabra-Hizk, M. A., W. A. Falker Jr., W. G. Merz, A. A. M. A. Baqui, J. I. Kelley, and T. F. Meiller.** 2000. Retrospective identification and characterization of *Candida dubliniensis* isolates among *Candida albicans* clinical laboratory isolates from Human Immunodeficiency Virus (HIV)-infected and non-infected individuals. *J. Clin. Microbiol.*, **38**:2423-2426.
19. **Jacob, L. S., C. M. Flaitz, M. Nichols, and J. M. Hicks.** 1998. Role of dentinal carious lesions in the pathogenesis of oral candidiasis in HIV infection. *JADA*, **129**:187-194.
20. **Kaminishi, H., Y. Hagihara, M. Tanaka, and T. Cho.** 1988. Degradation of bovine Achilles tendon collagen by *Candida albicans* protease. *J. Med. Vet. Mycol.*, **26**:315-318.

21. **Kerdpon, D., S. Pongsiriwet, K. Pangsomboom, A. Iamaroon, K. Kampoo, S. Sretrirutchai, A. Geater, and V. Robison.** 2004. Oral manifestations of HIV infection in relation to clinical and CD4 immunological status in northern and southern Thai patients. *Oral Dis.*, **10**:138-144.
22. **Kiffer-Moreira, T., A. C. S. Pinheiro, W. S. Alviano, F. M. Barbosa, T. Souto- Padrón, L. Nimrichter, M. L. Rodrigues, C. S. Alvino, and J. R. Meyer-Fernandes.** 2007. An ectophosphatase activity in *Candida parapsilosis* influences the interaction of fungi with epithelial cells. *FEMS Yeast Res.*, **7**:621-628.
23. **Kramer, P. f., C. A. Feldens, and A. N. Romano.** 2000. Diagnóstico da lesão de cárie oclusal. *In*: Kramer, P. f., C. A. Feldens, and A. N. Romano. Promoção de saúde bucal em odontopediatria – Diagnóstico, prevenção e tratamento da cárie oclusal, 1th ed., São Paulo, SP, Brasil.
24. **Lamey, P-J., A. Darwazeh, B. M. Fisher, L. P. Samaranayake, T. W. MacFarlane, and B. M. Frier.** 1988. Secretor status, candidal carriage and candidal infection in patients with diabetes mellitus. *J. Oral Pathol.*, **17**:354-357.
25. **Liu, X., H. Liu, Z. Guo, and W. Luan.** 2006. Association of asymptomatic oral candidal carriage, oral candidiasis and CD4<sup>+</sup> lymphocyte count in HIV-positive patients in China. *Oral Dis.*, **12**:41-44.
26. **Madigan, A., P. A. Murray, M. Houpt, F. Catalanotto, and M. Feuerman.** 1996. Caries experience and cariogenic markers in HIV-positive children and their siblings. *Pediatr. Dent.*, **18**:129-136.

27. **Manfredi, M., M. J. McCullough, Z. M. Al-Karaawi, P. Vescovi, and S. R. Porter.** 2006. *In vitro* evaluation of virulence attributes of *Candida* spp., isolated from patients affected by diabetes mellitus. *Oral Microbiol. Immunol.*, **211**:83-189.
28. **Mardegan, R. C., M. A. Foglio, R. B. Gonçalves, and J. F. Höfling.** 2006. *Candida albicans* proteases. *Braz. J. Oral. Sci.*, **5**:944-952.
29. **Naglik, J. R., S. J. Challacombe, and B. Hube.** 2003. *Candida albicans* secreted aspartyl proteases in virulence and pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Ver.*, **67**:400-428.
30. **Odds, F. C., and R. Bernaerts.** 1994. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.*, **32**:1923-1929.
31. **Ollert, M. W., C. Wende, M. Görlich, C. G. McMullan-Vogel, M. B-V Zepelin, C-W Vogel, and H. C. Korting.** 1995. Increased expression of *Candida albicans* secretory protease, a putative virulence factor, in isolates from Human Immunodeficiency Virus-positive patients. *J. Clin. Microbiol.*, **33**:2543-2549.
32. **Piesco, N. P.** Histologia da dentina. 2005. *In*: J. K. Avery. Desenvolvimento e histologia bucal., 3rd ed., Porto Alegre, RS / São Paulo, SP, Brasil.
33. **Pongsiriwet, S., A. Iamaroon, P. Sriburee, K. Pattanaporn, and S. Krisanaprakornkit.** 2004. Oral colonization of *Candida* species in perinatally HIV-infected children in Northern Thailand. *J. Oral Science*, **46**:101-105.

34. **Portela, M. B., I. P. R. Souza, E. M. M. B. Costa, A. N. Hagler, R. M. A. Soares, and A. L. S. Santos.** 2004. Differential recovery of *Candida* species from subgingival sites in Human Immunodeficiency Virus-Positive and healthy children from Rio de Janeiro, Brazil. *J. Clin. Microbiol.*, **42**:5925-5927.
35. **Rego, M. A., C. Y. Koga-Ito, and A. O. C. Jorge.** 2003. Effects of oral environment stabilization procedures on counts of *Candida* ssp. in children. *Pesqui. Odontol. Bras.*, **17**:322-326.
36. **Rodier, M-H., B. E. Moudni, C. Kauffmann-Lacroix, G. Daniault, and J-L. Jacquemin.** 1999. A *Candida albicans* metallopeptidase degrades constitutive proteins of extracellular matrix. *FEMS Microbiol. Lett.*, **177**:205-210.
37. **Santos, L. C., G. F. Castro, I. P. Souza, and R. H. S. Oliveira.** 2001. Oral manifestations related to immunosuppression degree in HIV-positive children. *Braz. Dent. J.*, **12**:135-138.
38. **Schaller, M., C. Borelli, H. C. Korting, and B. Hube.** 2005. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*, **48**:365-377.
39. **Sedgley, C. M., L. P. Samaranayake, J. C. Y. Chan, and S. H. Y. Wei.** 1997. A 4-year longitudinal study of the oral prevalence of enteric gram-negative rods and yeasts in Chinese children. *Oral Microbio. Immunol.*, **12**:183-188.
40. **Starr, J. R., T. C. White, B. G. Leroux, H. S. Luis, M. Bernardo, J. Leitão, and M. C. Roberts.** 2002. Persistence of oral *Candida albicans* carriage in healthy Portuguese schoolchildren followed for 3 years. *Oral Microbiol. Immunol.*, **17**:304-310.

41. **Sweet, S. P.** 1997. Selection and pathogenicity of *Candida albicans* in HIV infection. *Oral Dis.*, **3**(Suppl. 1):S88-S95.
  
42. **Sziegoleit, F., A. Sziegoleit, and W. E. Wetzel.** 1999. Effect of dental treatment and/or local application of amphotericin B to carious teeth on oral colonization by *Candida*. *Med. Mycol.*, **37**:345-350.

## TABLES

**Table 1.** Growth classification of *Candida* spp. isolated from dentine (D) and oral mucosa before (M1) and after (M2) dental treatment of HIV-infected children (n=30).

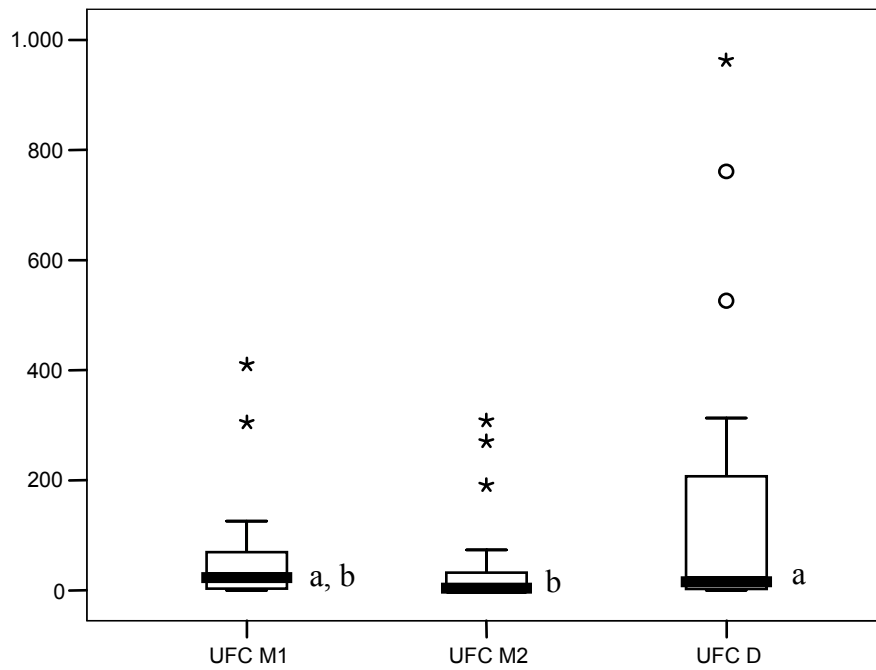
<b>Growth</b>	<b>D</b>	<b>M1</b>	<b>M2</b>
<b>Mild/Sparce</b>	8 (26,6%)	7 (23.4%)	7 (23.4%)
<b>Moderate</b>	5 (16,7%)	8 (26.6%)	8 (26.6%)
<b>Strong/Numerous</b>	11 (36,7%)	11 (36.7%)	4 (13.3%)
<b>Total</b>	24 (80%)	26 (86.7%)*	19 (63.3%)*

\* McNemar Chi-square test (p=0.065)

**Table 2.** *Candida* spp. isolated from dentine (D) and oral mucosa before (M1) and after (M2) dental treatment of HIV-infected children.

<b><i>Candida</i> species</b>	<b>D (n=24)</b>	<b>M1 (n=26)</b>	<b>M2 (n=19)</b>
<b><i>C. albicans</i></b>	24 (100%)	26 (100%)	18 (95%)
<b><i>C. tropicalis</i></b>	3 (12,5%)	3 (11,5%)	2 (10,5%)
<b><i>C. parapsilosis</i></b>	0	0	2 (10,5%)

## GRAPHS



**Graph 1.** Number of CFUs for *Candida* spp. isolated from dentine (D) and oral mucosa before (M1) and after (M2) dental treatment of HIV-infected children (Wilcoxon test: a:  $p=0.045$ ; b:  $p=0.049$ ).

## 4.2 Artigo 2

### **PROTEOLYTIC ACTIVITY OF *Candida albicans* ISOLATED FROM ORAL MUCOSA AND DENTINAL CARIOUS LESIONS OF HIV-INFECTED CHILDREN**

<sup>a</sup> Madeleine Souza das Chagas, <sup>a</sup> Glória Fernanda Barbosa de Araújo Castro, <sup>b</sup> Daniella Ferreira Cerqueira, <sup>a</sup> Ivete Pomarico Ribeiro de Souza, <sup>c</sup> Thaïs Souto-Padrón, <sup>c</sup> Maristela Barbosa Portela, <sup>c</sup> Rosangela Maria de Araújo Soares

<sup>a</sup> Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil; <sup>b</sup> Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, University of São Paulo; <sup>c</sup> Institute of Microbiology, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil.



## ABSTRACT

*Candida* species have several virulence factors, such as enzymes with collagenolytic activity. In the present study, type I collagen degradation by *Candida albicans* isolated from both oral mucosa (M) (23 strains) and cavitated active dentinal caries (CAD) (23 strains) of HIV-infected children was evaluated. The relationship between type I collagen degradation and predisposing factors as well as the presence of *Candida* spp. in dentinal carious lesions were also investigated. In order to verify proteolytic activity the specimens were cultivated in BHI medium and the supernatants were obtained through centrifugation, being then filtrated and concentrated. Each concentrated supernatant was incubated in the presence or absence of type I collagen and PMSF, a typical serine protease inhibitor, at 37°C for 12 hours and analyzed by using 10% SDS-PAGE. The supernatants of all *C. albicans* isolates had degraded the type I collagen, on average, in 38.3% (SD=21.67) of oral mucosa specimens and in 54% (SD=25.94) of dentine specimens and this latter specimens presents a greater intensity of degradation (Wilcoxon test,  $p < 0.05$ ). Also, inhibition of proteolytic active by PMSF could be seen in some isolates. A total of four extracted deciduous molars were longitudinally sectioned originating eight dental fragments that were analyzed by scanning electronic microscope (S.E.M.). Blastospores forms could be seen in dentinal carious lesions. Viral load and percentage of CD4 had no association with the percentage of type I collagen degradation (Mann-Whitney test,  $p > 0.05$ ). These results reveal that *C. albicans* isolated from different sites of the oral cavity of HIV-infected children has proteolytic activities for type I collagen, an important component of the human tooth structure, and that the presence of this yeast in dentinal carious lesions can contribute to progression of the carious process.

**Key-words:** *Candida albicans*, children, HIV, proteolytic enzymes, type I collagen

## INTRODUCTION

Yeasts are opportunistic pathogens since they can cause infections if the environment becomes favorable as situations of immunosuppression seen in HIV-infected patients (ARENDRORF & WALKER, 1980; HOSSAIN *et al.*, 2003; NAGLIK *et al.*, 2003). *Candida albicans* is the most prevalent etiological agent in oral candidiasis (CHIGURUPATI *et al.* 1996; SEN *et al.*, 1997; PONGSIRIWET *et al.*, 2004; PORTELA *et al.*, 2004; CHATTOPADHYAY *et al.*, 2005) and the factors involved in the virulence of this yeast are dimorphism, antigenic variation, immune modulation of the host defense mechanism (SWEET, 1997; COSTA *et al.* 2003; NIKAWA *et al.*, 2003), adhesins and secretion of proteases (MORSCHHÄUSER *et al.*, 1997; RODIER *et al.*, 1999; NAGLIK *et al.*, 2004; MANFREDI *et al.* 2006).

Proteases are proteolytic enzymes which play an important role in the pathogenesis of *C. albicans* (OLLERT *et al.* 1995; BOSCO *et al.*, 2003). This yeast can degrade various host's proteins such as the collagen (KAMINISHI *et al.*, 1986; DOUGLAS, 1988; SCHALLER *et al.*, 2005), particularly the type I collagen (KAMINISHI *et al.*, 1988; RODIER *et al.*, 1999; IMBERT *et al.*, 2002), which constitutes more than 90% of the dentine organic matrix (BERKOVITZ *et al.*, 2004; PIESCO, 2005). As a result, favorable conditions are created for adhesion, colonization and proliferation of this microorganism (KAMINISHI *et al.*, 1986; MORSCHHÄUSER *et al.*, 1997; BOSCO *et al.* 2003; NAGLIK *et al.*, 2004; MANFREDI *et al.*, 2006; MARDEGAN *et al.* 2006), thus further enhancing the caries development (NIKAWA *et al.* 2003). In addition, some authors have reported that *C. albicans* can co-aggregate with bacteria existing in the oral cavity, which favors their adhesion to oral mucosa and tooth structure (BAGG *et al.*, 1986; JENKINSON *et al.*, 1990; GRIMAUDO *et al.* 1996).

Studies have reported that HIV-infected children have a greater prevalence of caries compared to non-infected children (CASTRO *et al.*, 2004). The presence of *C. albicans* in carious lesions has been reported in the literature (HOSSAIN *et al.*, 2003). Jacob *et al.* (1998) demonstrated that the presence of this yeast in dentinal tubules of HIV-infected adults was higher than in non-infected patients. These findings seem to indicate that dentinal carious lesions in HIV-infected patients can serve as a niche for colonization and proliferation of *Candida* species (SZIEGOLEIT *et al.*, 1999; HOSSAIN *et al.*, 2003; REGO *et al.*, 2003). Moreover, the ability to degrade type I collagen make this fungus an important co-adjuvant in the caries process (NIKAWA *et al.*, 2003).

Therefore, the present study aimed to compare the capacity of type I collagen degradation by proteolytic enzymes secreted by *C. albicans* isolated from oral mucosa and dentinal carious lesions of HIV-infected children, investigating the relationship with predisposing factors and to verify the presence of *C. albicans* in dentinal carious lesions of these patients.

## **MATERIAL and METHODS**

### **Sample Collection**

The study group consisted of 23 HIV-infected children aged between 5 and 12 years, all from a Pediatric AIDS Outpatients Clinic from a Federal University, Rio de Janeiro (UFRJ), Brazil, and followed up at the Child Dentistry School through the SIDA/AIDS Project.

Children had definitive diagnosis for HIV infection confirmed by ELISA and Western Blot tests. In addition, they had to present 1-5 cavitated active dentinal carious lesions, at least 1 tooth being accessible to n°5 curette (Duflex ®), and they

could not be under antifungal therapy nor taking topical antimicrobial medication for at least 3 months prior to material collection.

All data regarding to children's personal information, medical recent history and laboratory exams (percentage of CD4 and viral load) were obtained from their respective medical records.

This study had the Ethics Committee Approval and informed consents were obtained from all children's legal guardians.

The collection of clinical specimens was performed by a single trained, after supervised tooth-brushing and visual exam of the oral cavity for presence of carious lesions (including white spots) and soft tissue lesions. For statistical analysis it was considered the total number of cavitated carious lesions (CCL) and cavitated active dentinal caries (CAD). CAD was classified if their aspects were moist, soft and yellow in color (KRAMER et al., 2000).

Oral mucosa (M) material was obtained by using a sterile swab, which was rubbed three times against the tongue's dorsal surface, jugal mucosa, and hard palate. After, the swab was put into a sterilized test tubes containing 1 ml of saline solution (0.85% NaCl).

The material from CAD was collected by using an n°5 sterile dentinal curette (Duflex ®) as follows: after removing the external layer of the dentinal carious lesions, three parts of inner layer and core dentine were obtained and then put into sterile *ependorffs* tubes of 1.5 ml, which had been previously weighted. Only one tooth had its dentine collected, but in those cases where the patient had more than 1 tooth with CAD, the specimen to be collected was that from the tooth presenting the

most extensive lesion. All samples were kept under refrigeration for laboratorial procedures within 2 hours.

Following the specimen collection, all the teeth had their caries-infected enamel and dentine tissues completely removed and then restored with glass-ionomer cement (VitroMolar<sup>®</sup>, DFL) according to the steps recommended by the Atraumatic Restorative Treatment (ART) (FRECKEN & HOLMGREN, 2001). Also, fluoride application (1.23% sodium fluoride) was topically performed and those patients with other dental needs were referred to the Child Dentistry School for such a procedure.

### **Proteolytic Activity**

A total of 46 specimens, paired, of *C. albicans* isolated from M (23 strains) and CAD (23 strains) of HIV-infected children were used. The samples were cultured in plates with a chromogenic agar (CHROMagar *Candida*<sup>®</sup>), identified by using biochemical tests for sugar assimilation and fermentation according to API *Candida* 20C system (Biomérieux, Marcy L'Etoile, France), and then kept inside screw-capped test tubes containing 5 ml of Sabouraud dextrose medium under refrigeration.

*C. albicans* strains of the agar plates were obtained by inoculating  $3.5 \times 10^5$  cells/ml isolated from M and CAD into a 50-ml Erlenmeyer flask containing 20 ml of Brain Heart Infusion (BHI - Difco, Bacto) medium, and grow at 37°C for 48 h in a orbital incubator shaker.

The supernatants were obtained by centrifugation (7000Xg, 8 min, at 4°C). Then, they were filtered in a 0.22- $\mu$ m membrane (Millipore) and 10ml were concentrated by ultrafiltration in a 10kDa membrane cut-off Centricon microconcentrators (Amicon, Bervely, MA, USA). The proteins existing in the

concentrated supernatants were quantified according to a method described by LOWRY *et al.* (1951), who used bovine serum albumin (BSA, SIGMA ®) as standard solution.

To verify the proteolytic activity, type I collagen, purified from rabbit skin (SIGMA ®), was used as protein substrate at concentration of 1mg/ml and solubilized according to the manufacturer's instructions and proteolytic enzyme inhibitor, PMSF 10mM, was used to identify the proteolytic enzyme class.

Degradation of type I collagen by proteolytic enzymes secreted by *C. albicans* was observed according to the different systems formations: containing or not protein substrate and 10mM PMSF (fluor de fenil-metil sulfonil). The systems were kept in 50mM sodium phosphate buffer (pH 5.5) and incubated at 37°C for 12 hours in a orbital incubator shaker. The resulting hydrolysed fragments were analysed using 10% SDS-PAGE gel (with 3% packing gel) (LAEMMLI, 1970) and electrophoresis was performed at 120V at room temperature.

The proteins were revealed by staining the gels with 0.2% Coomassie Brilliant Blue R-250 in a solution of methanol, acetic acid-water (50:10:40, v/v/v) and destained in another solution containing 7% methanol and 5% acetic acid which was mechanically shaken for approximately 16 hours. After the discoloration, the gels were kept in distilled water for 1 hour, photographed, and placed on cellophane paper at room temperature and left to dry.

Densitometric analyses of the bands were performed by using the image analysis software from Kodak Digital Science EDAS 120.

### **Scanning Electronic Microscopy (SEM)**

Four extracted deciduous molars, that had indication for extraction, were selected for study, all being washed with sterile solution (0.85% NaCl) and then fixed in 2.5% glutaraldehyde solution for 9 days (SEN et al., 1995). After fixation, the teeth were transversally sectioned to separate crown and root and then, the crown was longitudinally sectioned into 2 parts by using carborundum discs under refrigeration, originating eight dental fragments that were stored again in 2.5% glutaraldehyde solution for 3 days. The specimens were then washed with PBS and post-fixed with 1% osmium tetroxide solution in 0.1M sodium cacodilate buffer (pH 7.2) containing 0.8% potassium ferrocyanate and 5mM calcium chlorate, during 1 hour in the dark. Following this step, the fragments were washed again with PBS and gradually dehydrated with 30%, 50%, 70%, 80% and 90% ethanol and twice with absolute ethanol. Each dehydration step lasted 15 minutes.

After dehydration, the fragments were critically point dried and then metallised with application of a thin gold layer on their surface. The fragments were analysed by using a JEOL JSM-5310 scanning electronic microscope.

### **Statistical Analysis**

Data were analysed based on Wilcoxon and Mann-Whitney test by using SPSS 13.0 software, at significance level of 5%.

## **RESULTS**

The subjects mean age was 7.83 years ( $\pm 2.4$ ), and 14 of them were boys (60.9%). According to CDC criteria (1994), ten (43.5%) patients had no

imunossupression, ten (43.5%) had moderate imunossupression, three (13%) had severe imunossupression and fifteen (65.2%) presents moderate viral load.

Electrophoresis analysis using 10% SDS-PAGE and densitometry analysis of supernatants from the 46 *C. albicans* isolated from oral mucosa (23 strains) and dentinal caries (23 strains) have evidenced proteolytic activity on type I collagen in 100% of the specimens. The proteolytic activity inhibition was observed in some isolates of *C. albicans*, suggesting that the isolates are composed of serine proteinase, since the substrate degradation was inhibited by PMSF (Figure 1).

It was observed that, on average, *C. albicans* isolated from oral mucosa (M) presented 38.3% ( $\pm 21.67$ ) of type I collagen degradation and that of cavitated active dentinal caries (CAD) 54% ( $\pm 25.94$ ), demonstrating a statistically significant difference (Wilcoxon test,  $p=0.001$ ) (Figure 1) despite the fact that degradation was higher in 3 (13%) oral mucosa specimens.

By analyzing these three specimens in M presenting greater degradation compared to CAD, it was observed a mean degradation percentage of 40.9% ( $\pm 25.75$ ) and 24.03% ( $\pm 11.74$ ), respectively, but with no statistically significant difference (Wilcoxon test,  $p=0.109$ )

When the relation of percentage of CD4 and viral load, with the percentage of type I collagen degradation from oral mucosa (M) and cavitated active dentinal caries (CAD) were analysed, no statistically significant result was found (Mann-Whitney test:  $p>0.05$ ) (Graphs 2 and 3).

SEM analyses have revealed presence of *Candida* in the fragments analyzed (Figure 2).



## DISCUSSION

The virulence of *C. albicans* can be related to several factors such as its capacity of adhesion, which is the first step towards colonization (NAGLIK *et al.*, 2004; MARDEGAN *et al.*, 2006; TANIDA *et al.*, 2003). Oral surfaces are covered with a pellicle containing salivary components, including numberless proteins, which can influence on *C. albicans* adhesion to oral epithelium (NAGLIK *et al.* 2003; HOLMES *et al.*, 2002; MARDEGAN *et al.*, 2006; TANIDA *et al.*, 2003). Moreover, Grimaudo *et al.* (1996) have reported that *C. albicans* not only can co-aggregate with bacteria existing in the oral cavity but also use the bacterial metabolites for adhesion, thus corroborating other findings (JENKINSON *et al.*, 1990).

Secretion of proteolytic enzymes is considered a crucial factor regarding the *Candida* virulence as they are produced in greater amount by *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis*, which are the most virulent species. These enzymes can act at different pH levels, increasing *Candida* species adherence to different surfaces (NAGLIK *et al.*, 2004; BRAMONO *et al.* 2006; KUMAR *et al.*, 2006) that is favorable for their colonization and proliferation.

The results obtained in the present study showed that enzymes secreted by *C. albicans* isolated from oral mucosa and cavitated active dentinal caries incubated for 12hs in the presence of type I collagen was able to degrade this proteic substrate, after electrophoresis analysis.

The densitometry analysis showed that degradation of type I collagen was greater in the supernatants of *C. albicans* isolated from CAD. NIKAWA *et al.* (2003) and KAMINISHI *et al.* (1986) reported that *C. albicans* can produce lactic acid resulting from carbohydrate fermentation and dissolve the hydroxyapatite from the tooth structure, resulting in collagen exposure and consequent yeast adhesion.

According to some authors, proteolytic enzymes can degrade a variety of host proteins, particularly the type I collagen (KAMINISH *et al.*, 1986; IMBERT *et al.* 2002), the main component of the dentine organic matrix (PIESCO *et al.*, 2005; CHAUSSAIN-MILLER *et al.*, 2006), which can explain the difference between the proteolytic activity of secreted enzymes by *C. albicans* isolated from oral mucosa and cavitated active dentinal caries, suggesting that these enzymes degraded not only the proteic substrate (type I collagen purified from rabbit skin - SIGMA ®) but also collagen present in dentine.

Costa *et al.* (2003) compared the proteolytic active of *C. albicans* isolated from oral cavity of HIV-infected and healthy children, by using BHI as culture medium and PMSF and 10 mM 1,10-phenantroline to identify protease class. They found that all isolates presents proteolytic active and were inhibited by PMSF and phenantroline, suggesting that serine and metallo proteinase were the enzymes present in the isolates.

The present study used PMSF to identify the proteolytic enzymes class secreted by *C. albicans*, isolated from oral mucosa and cavitated active dentinal caries, which are involved in the degradation of type I collagen. It was observed proteolytic activity inhibition in some isolates of *C. albicans*, in the presence of PMSF, suggesting, as well as Costa *et al.* (2003), that the isolates are composed by serine proteinase.

Sen *et al.* (1997) and Waltimo *et al.* (2000) carried out an *in vitro* study and observed *C. albicans* colonization in dentinal tubules of extracted human molars. Data from this study using SEM analysis showed *Candida* blastospore forms in dentinal carious lesions. Besides this, bacteria co-aggregated with *C. albicans* were found corroborating with Grimaudo and co-workers (1996), who reported that

bacterial metabolites further facilitates the adhesion of this fungus. These findings suggest that presence of this yeast in dentinal carious lesions can contribute to progression of the carious process as their adhesion ability is further enhanced (SENET, 1997; SWEET *et al.*, 1997; NAGLIK *et al.* 2003)

The current data indicate that enzymes secreted by *C. albicans* isolated from oral mucosa and dentinal carious lesions of HIV-infected children can degrade the type I collagen, an important organic component of dentine, despite their distinctive proteolytic activities. Furthermore, the presence of *Candida* in dentinal carious lesions can be considered a factor contributing to and accelerating the caries process, perhaps being one of the possible explanations of the rapid caries progression in these patients.

## REFERENCES

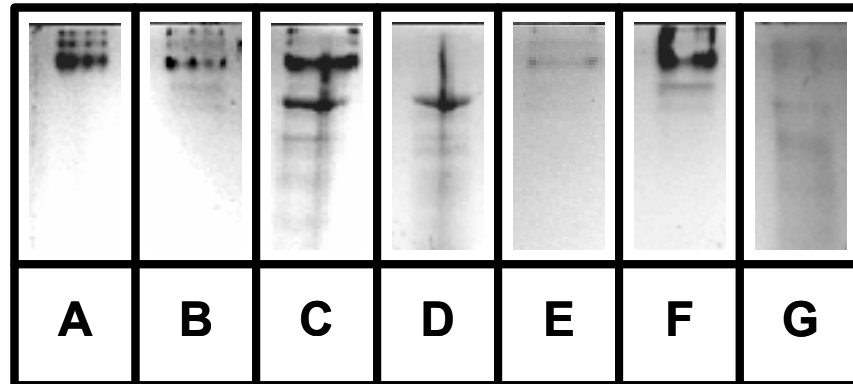
1. ARENDORF TM, WALKER DM. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. **Archs Oral Biol**, v. 25, p. 1-10, 1980.
2. BAGG J & SILVERWOOD RW. Coagglutination reactions between *Candida albicans* and oral bacteria. **J Med Microbiol**, v. 22, p. 165-169, 1986.
3. BERKOVITZ BKB, HOLLAND GR, MOXHAN BJ. Dentina. In: \_\_\_\_\_ Anatomia, embriologia e histologia bucal. **ARTMED**, 3ª edição, 2004.
4. BOSCO VL, BIRMAN EG, CURY AE, PAULA CR. Yeasts from the oral cavity of children with AIDS: exoenzyme production and antifungal resistance. **Pesqui Odontol Bras**, v.17, p.217-222, 2003.
5. BRAMONO K, YAMAZAKI M, TSUBOI R, OGAWA H. Comparison of protease, lipase, and alpha-glucosidase activities from the clinical isolates of *Candida* species. **Jpn J Infect Dis**, v. 59, p. 73-76, 2006.
6. CASTRO GF, SOUZA IPR, LOPES S *et al.* Salivary IgA to cariogenic bacteria in HIV-positive children and its correlation with caries prevalence and levels of cariogenic microorganisms. **Oral Microbiol Immunol**, v. 19, p. 281-288, 2004.
7. Center for Disease Control and Prevention – 1994 revised classification system for human immunodeficiency virus infection in children less than 13 years of age. **MMWR**, v. 43, n. RR12, p. 1-10, 1994.
8. CHATTOPADHYAY A, CAPLAN DJ, SLADE GD *et al.* Risk indicators for oral candidiasis and oral hairy leukoplakia in HIV-infected adults. **Community Dent Oral Epidemiol**, v. 33, p. 35-44, 2005.
9. CHAUSSAIN-MILLER C, FIORETTI F, GOLDBERG M, MENASHI S. The role of matrix metalloproteases (MMPs) in human caries. **J Dent Res**, v. 85, p.22-32, 2006.
10. CHIGURUPATI R, RAGHAVAN SS, STUDEN-PAVLOVICH DA. Pediatric HIV infection and its oral manifestations: a review. **Pediat Dent** v. 18, p. 106-113, 1996.
11. COSTA EMMB, SANTOS ALS, CARDOSO AS *et al.* Heterogeneity of metallo and serine extracellular proteases in oral clinical isolates of *Candida albicans* in HIV-positive and healthy children from Rio de Janeiro. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 38, p. 173-180, 2003.
12. DOUGLAS LJ. *Candida* proteases and Candidosis. **Critical Rev Biotechnol**, v. 8, p. 121-129, 1988.
13. FRENCKEN JE & HOLMGREN CJ. Tratamento Restaurador Atraumático (ART) para a Cárie Dentária. **Santos Editora**, 1ª edição, 2001.

14. GRIMAUDDO NJ, NESBITT WE, CLARK WB. Coaggregation of *Candida albicans* with oral *Actinomyces* species. **Oral Microbiol Immunol**, v. 11, p. 59-61, 1996.
15. HOLMES AR, BANDARA BMW, CANNON RD. Saliva promotes *Candida albicans*. Adherence to human epithelial cells. **J Dent Res**, v. 81, n. 8, p.28-32, 2002.
16. HOSSAIN H, ANSARI F, SCHULZ-WEIDNER N *et al.* Clonal identity of *Candida albicans* in the oral cavity and the gastrointestinal tract of pre-school children. **Oral Microbiol Immunol**, v. 18, p. 302-308, 2003.
17. IMBERT C, KAUFFMANN C, DANIAULT G *et al.* Effect of matrix metalloprotease inhibitors on the 95 kDa metallopeptidase of *Candida albicans*. **J Antimicrob Chem**, v. 49, p. 1007-1010, 2002.
18. JACOB LS, FLAITZ CM, NICHOLS M, HICKS JM. Role of dentinal carious lesions in the pathogenesis of oral candidiasis in HIV infection. **JADA**, v. 129, p. 187-194, 1998.
19. JENKINSON HF, LALA HC, SHEPHERD MG. Coaggregation of *Streptococcus sanguis* and other *Streptococci* with *Candida albicans*. **Infect Immun**, v. 58, n. 5, p. 1429-1436, 1990.
20. KAMINISHI H, HAGIHARA Y, HAYASHI S, CHO T. Isolation and characteristics of collagenolytic enzyme produced by *Candida albicans*. **Infect Immun**, v. 53, p. 312-316, 1986.
21. KAMINISHI H, HAGIHARA Y, TANAKA M, CHO T. Degradation of bovine Achilles tendon collagen by *Candida albicans* protease. **J Med Vet Mycol**, v. 26, p. 315-318, 1988.
22. KRAMER PF, FELDENS CA, ROMANO AN. **Promoção de saúde bucal em odontopediatria – Diagnóstico, prevenção e tratamento da cárie oclusal**. Editora Artes Médicas, 1a edição, 2000.
23. KUMAR CPG, KUMAR SSJ, MENON T. Phospholipase and protease activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. **Mycopathologia**, v. 161, p. 213-218, 2006.
24. LAEMMLI OK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
25. LOWRY OH, ROZEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, p. 265-275, 1951.
26. MANFREDI M, MCCULLOUGH MJ, AL-KARAAWI ZM *et al.* *In vitro* evaluation of virulence attributes of *Candida* spp, isolada de pacientes afetados pela diabete melitos. **Oral Microbiol Immunol**, v. 21, p. 183-189, 2006.

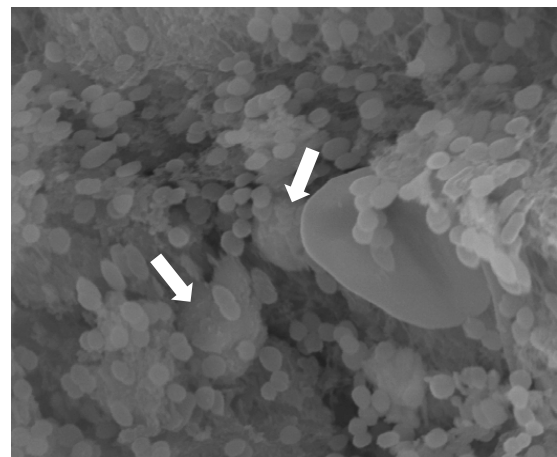
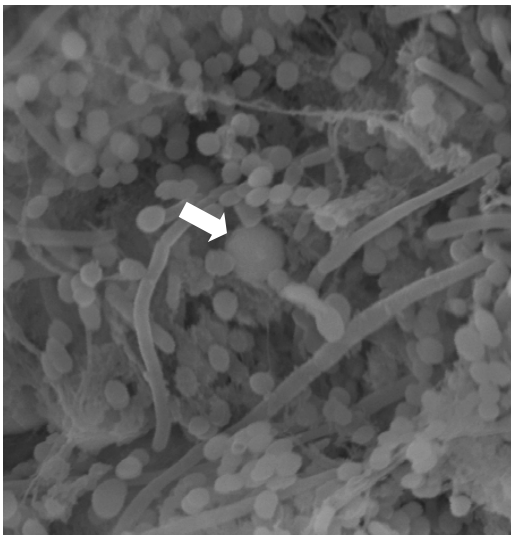
27. MARDEGAN RC, FOGLIO MA, GONÇALVES RB, HÖFLING JF. *Candida albicans* proteases. **Braz J Oral Sci**, v. 5, p. 944-952, 2006.
28. MORSCHHÄUSER J, VIRKOLA R, KORHONEN TK, HACKER J. Degradation of human subendothelial extracellular matrix by protease-secreting *Candida albicans*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 153, p. 349-355, 1997.
29. NAGLIK J, ALBRECHT A, BADER O, HUBE B. *Candida albicans* proteases and host/pathogen interactions. **Cell Microbiol**, v. 6, p. 915-926, 2004.
30. NAGLIK J, CHALLACOMBE SJ, HUBE B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteases in virulence and pathogenesis. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 67, p. 400-428, 2003.
31. NIKAWA H, YAMASHIRO H, MAKIHIRA S. *et al.* *In vitro* cariogenic potential of *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 46, p. 471-478, 2003.
32. OLLERT MW, WENDE C, GÖRLICH M *et al.* Increased expression of *Candida albicans* secretory protease, a putative virulence factor, in isolates from human immunodeficiency virus-positive patients. **J Clin Microbiol**, v. 33, p. 2543-2549, 1995.
33. PIESCO NP. Histologia da dentina. *In*: AVERY JK. Desenvolvimento e histologia bucal. **ARTMED**, 3ª edição, 2005.
34. PONGSIRIWET S, IAMAROON A, SRIBUREE P *et al.* Oral colonization of *Candida* species in perinatally HIV-infected children in Northern Thailand. **J Oral Science**, v. 46, p. 101-105, 2004.
35. PORTELA MB, SOUZA IPR, COSTA EMMB. *et al.* Differential recovery of *Candida* species from subgingival sites in Human Immunodeficiency Virus-Positive and healthy children from Rio de Janeiro, Brazil. **J Clin Microbiol**, v. 42, p. 5925-5927, 2004.
36. REGO MA, KOGA-ITO CY, JORGE, AOC. Effects of oral environment stabilization procedures on counts of *Candida* ssp. in children. **Pesqui Odontol Bras**, v. 17, p. 322-326, 2003.
37. RODIER M-H, MOUDNI BE, KAUFFMANN-LACROIX C *et al.* A *Candida albicans* metallopeptidase degrades constitutive proteins of extracellular matrix. **FEMS Microbiol Lett**, v. 177, p. 205-210, 1999.
38. SCHALLER M, BORELLI C, KORTING HC, HUBE B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 48, p. 365-377, 2005.
39. SEN BH, SAFAVI KE, SPANGBERG LSW. Colonization of *Candida albicans* on cleaned human dental hard tissues. **Archs Oral Biol**, v. 42, p. 513-520, 1997.
40. SENET JM. Risk factors and physiopathology of candidiasis. **Rev Iberoam Micol**, v. 14, p. 6-13, 1997.

41. SWEET SP. Selection and pathogenicity of *Candida albicans* in HIV infection. **Oral Dis**, v. 3, p. S88-S95, 1997.
42. SZIEGOLEIT F, SZIEGOLEIT A, WETZEL WE Effect of dental treatment and/or local application of amphotericin B to carious teeth on oral colonization by *Candida*. **Med Mycol**, v. 37, p. 345-350, 1999.
43. TANIDA T, OKAMOTO T, OKAMOTO A *et al.* Decreased excretion of antimicrobial proteins and peptides in saliva of patients with oral candidiasis. **J Oral Pathol Méd**, v. 32, p. 586-594, 2003.
44. WALTIMO, T.M.T; ORSTAVIK, D.; SIRÉN, E.K.; HAAPASALO, M.P. *In vitro* yeast infection of human dentin. **J Endod.**, v. 26, n. 4, p. 207-209, April, 2000.

## Figures

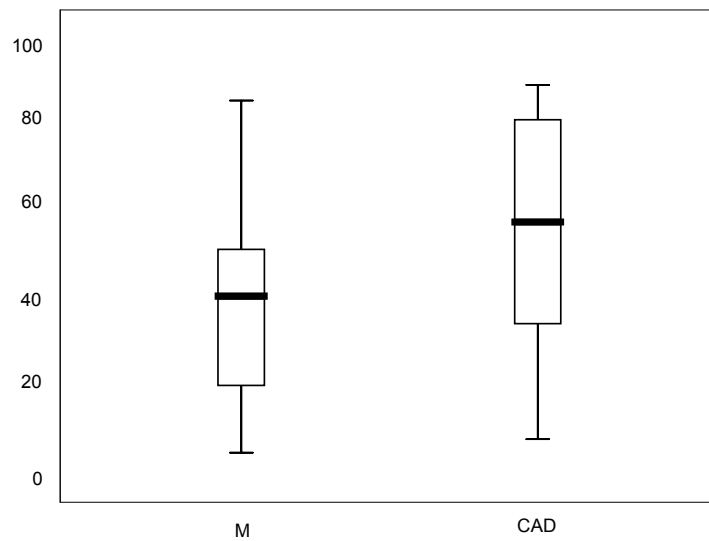


**Figure 1.** : Cleavage of soluble type I collagen by extracellular protease activities of *C. albicans* isolated from oral mucosa and dentinal caries isolates of HIV-infected children. A (control) – Type I collagen; B (oral mucosa) and E (dentine) – Type I collagen + *C. albicans* supernatant; C (oral mucosa) and F (dentine) – Type I collagen + *C. albicans* supernatant + PMSF; D (oral mucosa) and G (dentine) – *C. albicans* supernatant.

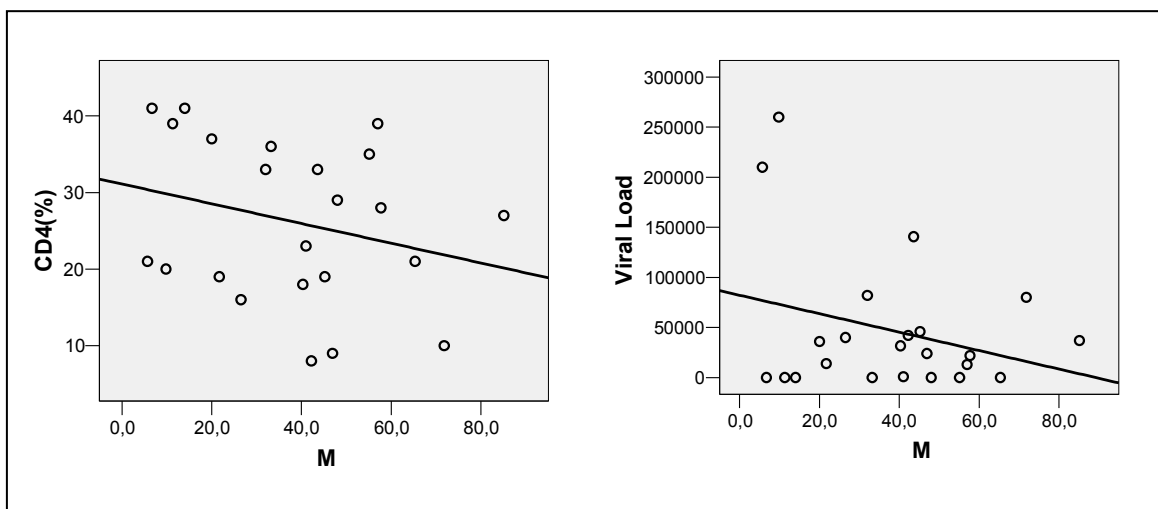


**Figure 2:** Scanning electron microscopy (S.E.M.) showing *Candida* in dentinal carious lesions.

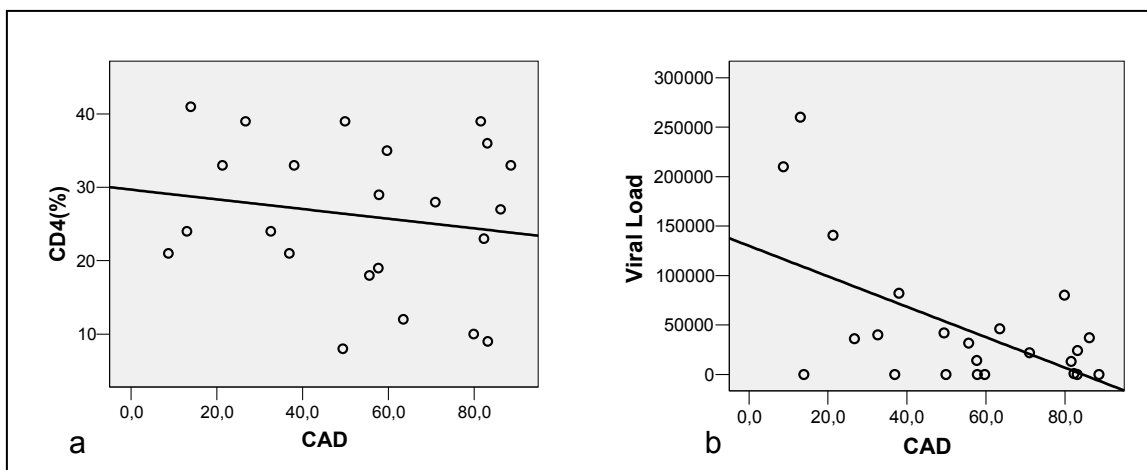




**Graph 1.** Percentage of type I collagen degradation by *C. albicans* isolated from oral mucosa (M) and cavitated active dentinal caries (CAD) based on densitometry analysis of the degradation bands (Wilcoxon test,  $p=0.001$ ).



**Graph 2:** Relation of percentage of type I collagen degradation by *C. albicans* isolated from oral mucosa with CD4 (a) and viral load (b). (Mann-Whitney test: a)  $p=0.386$ , b)  $p=0.275$ )



**Graph 3:** Relation of percentage of type I collagen degradation by *C. albicans* isolated from cavitated active dentinal caries (CAD) with CD4 (a) and viral load (b). (Mann-Whitney test: a)  $p=0.564$ , b)  $p=0.127$ )

## 5. DISCUSSÃO

Alguns autores relatam uma maior prevalência de cárie em crianças infectadas pelo HIV quando comparadas às não-infectadas (CASTRO *et al.*, 2004; HODGSON *et al.*, 2006b; CERQUEIRA *et al.*, 2007). Além disso, vários estudos demonstram uma associação entre *Candida* spp. e cárie dentária (STARR *et al.*, 2002; HOSSAIN *et al.* 2003; REGO *et al.* 2003). Cerqueira *et al.* (2007) observaram que crianças com maior número de lesões cáries em dentina, apresentavam uma alta prevalência de *Candida* spp., sugerindo ser estas lesões mais um fator de risco para a colonização bucal por espécies de *Candida* nestes pacientes. Rego *et al.* (2003) verificaram uma diminuição na prevalência de *Candida*, após o tratamento odontológico, demonstrando sua importância no controle da colonização de *Candida* spp. na cavidade bucal.

Diante disso, o primeiro artigo do presente estudo teve como objetivo determinar a prevalência de espécies de *Candida* na mucosa bucal, antes e depois do tratamento odontológico e na dentina cariada, além de verificar os possíveis fatores envolvidos, dentre eles a imunossupressão e presença de cárie dentária em crianças infectadas pelo HIV.

Durante a coleta dos espécimes clínicos da mucosa bucal optou-se por utilizar o método de coleta através do swab devido a sua praticidade. O grupo envolvido na pesquisa foi composto por crianças, algumas delas muito jovens (4 anos de idade), que teriam dificuldade em cooperar na técnica da saliva estimulada, já que esta necessita de mais tempo e de uma maior colaboração do paciente para expectorar a saliva.

Como resultado, foi encontrada uma elevada prevalência de *Candida*, na mucosa bucal e na dentina cariada, corroborando os achados de Sziegoleit *et al.* (1999) que observaram que crianças com cárie apresentaram uma elevada colonização por *Candida* na saliva e na dentina, associando a alta prevalência encontrada na saliva ao elevado número desta levedura na dentina cariada. Entretanto, após o tratamento odontológico, ocorreu uma diminuição significativa na prevalência de *Candida*, como relatado por Starr *et al.* (2002) e Rego *et al.* (2003) que realizaram estudos com crianças saudáveis.

Cabe ressaltar que a dentina cariada apresentou um número de UFC estatisticamente maior em relação à mucosa, sendo este um resultado semelhante ao encontrado por Hossain *et al.* (2003), que em um estudo com crianças encontrou maior número de UFC em dentina quando comparado ao da saliva, mostrando que lesões cariosas cavitadas podem servir de nicho para colonização e proliferação desta levedura.

Vale lembrar que lesões cariosas cavitadas funcionam como sítio de retenção para *Candida* spp. E, no caso de lesão de carie em dentina, a presença de colágeno tipo I favorece esta retenção, já que estas leveduras são capazes de degradar este tipo de proteína através da secreção de enzimas proteolíticas (RODIER *et al.*, 1999; IMBERT *et al.*, 2002) Pode-se explicar então o fato da dentina cariada ter apresentado um número de UFC maior em relação à mucosa bucal.

Alguns autores relatam que a *C. albicans* é a espécie mais prevalente em lesões de candidíase (ARENDORF & WALKER, 1980; SEN *et al.*, 1997; PORTELA *et al.*, 2004; CERQUEIRA *et al.*, 2007), assim como em isolados de saliva e dentina (HOSSAIN *et al.*, 2003). O presente estudo também encontrou esta espécie com maior frequência nos isolados da mucosa bucal e da dentina cariada, seguida da *C.*

*tropicalis* e *C. parapsilosis*. Sedgley e colaboradores (1997) sugerem que a colonização de espécies de *Candida* na cavidade bucal de crianças é transitória, pois, segundo estes autores, existe uma instabilidade na microbiota oral destes pacientes, o que pode explicar a variedade de espécies de *Candida*, encontrada no presente estudo.

Ao contrário do relatado por vários estudos, não foi encontrada associação entre percentual de CD4, carga viral e uso de medicamentos com ou sem HAART, com a prevalência de *Candida* spp. na cavidade bucal, talvez porque a maioria dos pacientes que participaram deste estudo apresentavam um quadro de imunossupressão controlado. Portanto pode-se considerar que o tratamento odontológico foi suficiente para reduzir a colonização de *Candida* na cavidade bucal, mostrando assim sua eficiência na eliminação de nichos para proliferação desta levedura.

O número elevado de UFC de *Candida* na cavidade bucal pode favorecer o surgimento de lesões de candidíase. Além do tratamento odontológico, o uso de medicamentos pode se fazer necessário para diminuir o número destas leveduras na cavidade bucal de pacientes infectados, prevenindo assim o aparecimento da lesão clínica. Antifúngicos como a Nistatina são os medicamentos mais utilizados para o tratamento destas lesões, porém, alguns autores relatam que substâncias como clorexidina, óleo de melaleuca e violeta de genciana, além de possuírem baixo custo, podem ser de grande valia no tratamento da candidíase bucal (CHALLACOMBE *et al.*, 2006; HODGSON *et al.*, 2006b), sendo portanto necessários mais estudos sobre a verdadeira atuação destas substâncias em espécies de *Candida*.

A *C. albicans* possui vários fatores de virulência, dentre os quais se destacam dimorfismo, variação antigênica, imunomodulação dos mecanismos de defesa do hospedeiro (SWEET, 1997; NIKAWA *et al.*, 2003), adesinas e proteases secretadas (NIKAWA *et al.*, 2003; NAGLIK *et al.*, 2003; PONGSIRIWET *et al.*, 2004).

Vários são os fatores que colaboram para o aumento da adesão de *Candida* às células epiteliais, considerada o primeiro passo para a colonização desta levedura. A capacidade de se coagregar com bactérias presentes na cavidade bucal (BAGG *et al.*, 1986; JENKINSON *et al.*, 1990), aumentam a adesão da *Candida*.

A *C. albicans* secreta enzimas proteolíticas capazes de atuar em ambientes com diferentes níveis de pH (NAGLIK *et al.*, 2004; BRAMONO *et al.*, 2006; KUMAR *et al.*, 2006) e degradar várias proteínas do hospedeiro, dentre elas o colágeno tipo I (KAMINISH *et al.*, 1986; IMBERT *et al.*, 2002), principal componente da dentina (PIESCO, 2005). É relatada uma expressão maior dessas enzimas por espécies de *Candida* isoladas de pacientes infectados pelo HIV, quando comparados aos pacientes soronegativos (OLLERT *et al.*, 1995; BOSCO *et al.*, 2003; COSTA *et al.*, 2003).

Com o objetivo de analisar a capacidade de proteases secretadas por *C. albicans*, isolada da mucosa bucal e da dentina cariada, em degradar colágeno tipo I e verificar sua presença em lesões cariosas de crianças infectadas pelo HIV, analisando ainda os possíveis fatores envolvidos, elaborou-se o segundo artigo deste trabalho. Foi observado que as enzimas secretadas por isolados de *C. albicans* oriundos dos dois sítios foram capazes de degradar colágeno tipo I, sendo que os isolados da dentina apresentaram um perfil de degradação mais intenso do que os isolados da mucosa.

Estudos relatam que a *C. albicans* é capaz de fermentar carboidratos e assim produzir ácido láctico, que dissolve hidroxiapatita, expondo o colágeno da estrutura dentária (NIKAWA *et al.*, 2003). Além disso, a dentina cariada é composta em sua maioria por colágeno tipo I que, ao sofrer alterações, funciona como sítio de adesão para *C. albicans*.

Em 2003, Costa e colaboradores realizaram um estudo com crianças brasileiras, infectadas pelo HIV e crianças saudáveis, onde foram utilizados isolados de *C. albicans* da cavidade bucal, para analisar a atividade proteolítica de enzimas secretadas por esta levedura. Os isolados foram crescidos em 10 ml de BHI líquido a 37°C, sob agitação por 48 horas e, para identificar a classe de proteases, foram utilizados inibidores proteolíticos como PMSF (fluoreto de fenil -metil sulfonil -inibidor de serina e cisteína proteases) e fenantrolina (1,10-fenantrolina - inibidor de metaloprotease). Os resultados mostraram que todos os isolados apresentaram atividade proteolítica, sendo serina e metaloprotease as enzimas encontradas, já que o PMSF e a fenantrolina foram capazes de inibir a ação destas enzimas.

Como parte deste estudo, objetivando determinar as funções gerais e específicas das proteases secretadas por espécies de *Candida*, analisou-se também o perfil de atividade frente a inibidores proteolíticos. Assim como o estudo descrito acima (COSTA *et al.*, 2003), a presente pesquisa utilizou PMSF a 10mM, visando identificar a protease secretada por *C. albicans* responsável pela degradação de colágeno tipo I, nos isolados da mucosa bucal e de lesões cariosas cavitadas ativas em dentina. Verificou-se que quando os isolados foram colocados na presença do PMSF, ocorreu inibição da degradação de colágeno. Diante disso, acredita-se que a enzima secretada pela *C. albicans* oriunda dos isolados, é a serina protease, visto que o PMSF é um inibidor desta enzima.

Apesar de no presente estudo a enzima encontrada ter sido da classe serina protease, pois o cultivo das leveduras foi em meio BHI líquido, que induz a expressão desta classe de enzima, vale ressaltar que aspártico-proteases secretadas (Saps) são de fundamental importância na patogênese da candidíase. As Saps degradam também mucina e IgA, proteínas salivares que funcionam como uma barreira de proteção do hospedeiro e, são capazes de induzir a formação de hifas, promovendo condições favoráveis para adesão, colonização e desenvolvimento de tal microorganismo, facilitando sua multiplicação (NAGLIK *et al.*, 2003).

Considerando que a dentina é constituída basicamente (95%) por colágeno tipo I, pode-se sugerir que este seja o motivo pelo qual ocorreu uma degradação maior por isolados da dentina cariada.

Em 1998, Jacob e colaboradores observaram a presença de *Candida* em túbulos dentinários de pacientes infectados pelo HIV, enquanto Grimaudo *et al.* (1996), relataram a presença de *C. albicans* coagregadas com bactérias, nos túbulos dentinários. O segundo artigo analisou também a presença desta levedura em lesões cariosas através do M.E.V.. Os resultados mostraram a presença de *C. albicans*, na dentina cariada, coagregada com bactérias, o que provavelmente tem um papel relevante na virulência desta levedura, já que os metabólitos produzidos por essas bactérias servem de nutrientes para *C. albicans* aumentando sua adesão às superfícies bucais, favorecendo sua colonização na cavidade bucal (JENKINSON *et al.*, 1990).

Com base nos resultados, conclui-se que lesões cariosas cavitadas em dentina podem funcionar como nichos para colonização e proliferação de *Candida*, assim como se observou uma expressão majoritária de serina proteases com especificidade para degradação do colágeno tipo I. Destaca-se a importância da



implementação de programas de atenção a saúde bucal, principalmente, de crianças infectadas pelo HIV, juntamente com uma equipe multidisciplinar, visando eliminar os nichos de colonização de *Candida* na cavidade bucal, diminuindo ainda a prevalência de lesões bucais e melhorando, conseqüentemente, a qualidade de vida destes pacientes.

## 6. CONCLUSÕES

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

1. A maioria dos pacientes apresentou *Candida* spp. na dentina e na mucosa bucal, antes do tratamento odontológico. Após o tratamento odontológico observou-se uma diminuição significativa no número de UFC de *Candida* spp., na mucosa bucal.
2. A espécie mais prevalente antes e depois do tratamento odontológico foi a *C. albicans*, seguida por *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*.
3. A presença de lesões cariosas cavitadas influenciou no número elevado de UFC encontrado na mucosa bucal antes do tratamento odontológico.
4. Fatores como percentual de CD4, carga viral e uso de antiretrovirais, incluindo ou não HAART, não influenciaram na redução da prevalência de *Candida* spp., na cavidade bucal.
5. A microscopia eletrônica de varredura revelou a presença de *Candida* em lesões de cárie em dentina de crianças infectadas pelo HIV.
6. As enzimas secretadas por *C. albicans* isolada da mucosa bucal e dentina cariada de pacientes infectados pelo HIV, são predominantemente serina proteases, e, foram capazes de degradar colágeno tipo I, sendo observada uma degradação mais intensa pelos isolados da dentina cariada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

BRAMONO K, YAMAZAKI M, TSUBOI R, OGAWA H. Comparison of protease, lipase, and alpha-glucosidase activities from the clinical isolates of *Candida* species. **Jpn J Infect Dis**, v. 59, p. 73-76, 2006.

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

CASTRO GF, SOUZA IPR, LOPES S *et al.* Salivary IgA to cariogenic bacteria in HIV-positive children and its correlation with caries prevalence and levels of cariogenic microorganisms. **Oral Microbiol Immunol**, v. 19, p. 281-288, 2004.

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

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

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

COOGAN MM, GREENSPAN JG, CHALLACOMBE SJ. Oral lesions in infection with human immunodeficiency virus. **Bulletin World Health Organization**, v. 83, n. 9, p. 700-706, 2005.

COSTA EMMB, SANTOS ALS, CARDOSO AS *et al.* Heterogeneity of metallo and serine extracellular proteases in oral clinical isolates of *Candida albicans* in HIV-

positive and healthy children from Rio de Janeiro. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 38, p. 173-180, 2003.

DOUGLAS, L.J. *Candida* proteases and Candidosis. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 121-129, 1988.

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

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

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

GRIMAUDDO NJ, NESBITT WE, CLARK WB. Coaggregation of *Candida albicans* with oral *Actinomyces* species. **Oral Microbiol Immunol**, v. 11, p. 59-61, 1996.

HODGSON TA, GREENSPAN D, GREENSPAN JS. Oral lesions of HIV disease and HAART in industrialized countries. **Adv Dent Res**, v. 19, p. 57-62, 2006a.

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

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

IMBERT C, KAUFFMANN C, DANIAULT G *et al.* Effect of matrix metalloprotease inhibitors on the 95 kDa metallopeptidase of *Candida albicans*. **J Antimicrob Chem**, v. 49, p. 1007-1010, 2002.

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

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

JENKINSON HF, LALA HC, SHEPHERD MG. Coaggregation of *Streptococcus sanguis* and other *Streptococci* with *Candida albicans*. **Infect Immun**, v. 58, n. 5, p. 1429-1436, 1990.

KAMINISHI H, HAGIHARA Y, HAYASHI S, CHO T. Isolation and characteristics of collagenolytic enzyme produced by *Candida albicans*. **Infect Immun**, v. 53, p. 312-316, 1986.

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

KUMAR CPG, KUMAR SSJ, MENON T. Phospholipase and protease activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. **Mycopathologia**, v. 161, p. 213-218, 2006.

LEGGOTT, P.J. Oral manifestations of HIV infection in children. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 73. n. 2, p. 187-193, Feb., 1992.

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

MADIGAN, A.; MURRAY, P.A.; HOUP, M. *et al.* Caries experience and cariogenic markers in HIV-positive children and their siblings. **Pediatr. Dent.**, v. 18, n. 2, p.129-136, 1996.

MIZIARA ID, FILHO BCA, WEBER R. Oral lesions in Brazilian HIV-infected undergoing HAART. **Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 70, p. 1089-1096, 2006.

NAGLIK J, ALBRECHT A, BADER O, HUBE B *Candida albicans* proteases and host/pathogen interactions. **Cell Microbiol**, v. 6, p. 915-926, 2004.

NAGLIK JR, CHALLACOMBE SJ, HUBE B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteases in virulence and pathogenesis. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 67, p.400-428, 2003

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

NICOLATOU-GALITIS, O.; VELEGRAKI, A.; PAIKOS, S. *et al.* Effect of PI-HAART on the prevalence of oral lesions in HIV-1 infected patients. A Greek study. **Oral Dis**, v. 10, p. 145-150, 2004.

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

OLLERT, M.W.; WENDE, C.; GORLICH, M. *et al.* Increased expression of *Candida albicans* secretory protease, a putative virulence factor, in isolates from Human Immunodeficiency Virus-positive patients. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 10, p. 2543-2549, Oct., 1995.

PIESCO NP. Histologia da dentina. *In*: AVERY JK. Desenvolvimento e histologia bucal. **ARTMED**, 3ª edição, 2005.

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

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

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

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

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

SCHEUTZ, F.; MATEE, M.I.; SIMON, I. *et al.* Association between carriage of oral yeasts, malnutrition and HIV-1 infection among Tanzanian children aged 18 months to 5 years. **Community Dent Oral Epidemiol**, v. 25, p. 193-198, 1997.

SEDGLEY CM, SAMARANAYAKE LP, CHAN JCY, WEI SHY. A 4-year longitudinal study of the oral prevalence of enteric gram-negative rods and yeasts in Chinese children. **Oral Microbiol Immunol**, v. 12, p. 183-188, 1997.

SEN, B.H.; SAFAVI, K.E.; SPANGBERG, L.S.W. Colonization of *Candida albicans* on cleaned human dental hard tissues. **Arch Oral Biol**, v. 42, n.7, p. 513-520, 1997.

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

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

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

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

TANIDA T, OKAMOTO T, OKAMOTO *et al.* Decreased excretion of antimicrobial proteins and peptides in saliva of patients with oral candidiasis. **J Oral Pathol**, v. 32, p. 586-594, 2003.

UNAIDS – UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS. **AIDS epidemic update**. 2007. Disponível em: [www.unaids.org](http://www.unaids.org). Acesso em 28 de novembro de 2007.

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

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

## ANEXOS



## ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO DE JANEIRO  
UFRJ

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

MEMORANDO DE APROVAÇÃO

O projeto "Prevalência de candida spp isoladas da mucosa bucal e de lesões cáries cavitadas em dentina de crianças infectadas pelo HIV", de número 28/06, de responsabilidade da Dra. Madeleine Souza das Chagas, foi analisado pelo CEP/IPPMG e aprovado em 1º de agosto de 2006.

Rio de Janeiro, 1º de agosto de 2006

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Ricardo Hugo da Silva e Oliveira".

Ricardo Hugo da Silva e Oliveira  
Coordenador do CEP/IPPMG

**ANEXO 2**

FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
 DEPARTAMENTO DE ODONTOPEDIATRIA E ORTODONTIA  
 DISCIPLINA DE ODONTOPEDIATRIA

**Consentimento Livre e Esclarecido**

Prevalência de *Candida* spp Isoladas da Mucosa Bucal e de Lesões Cariosas Cavitadas em Dentina de Crianças Infectadas Pelo HIV.

Prezado responsável,

A Disciplina de Odontopediatria da UFRJ e o Projeto SIDA/AIDS do IPPMG estão estudando os tipos de micróbios que habitam a boca das crianças infectadas pelo HIV em tratamento no ambulatório da DIP-Imuno do IPPMG. Para isso, será necessário colher um pouco da saliva e de cárie da criança, para ser estudada num laboratório e será feito um exame clínico da cavidade bucal. A criança também receberá escovação supervisionada e aplicação de flúor. Caso ela necessite de tratamento odontológico restaurador, ela receberá a(s) obturações necessárias no próprio projeto, e havendo necessidade de extrações ela será encaminhada para a Clínica de Odontopediatria – FO/UFRJ.

O estudo está de acordo com o estabelecido na Resolução do CNS 196/96 e suas complementares e com o Código de Ética Médica de 1988. A participação é voluntária e em casos de desistência, a criança não sofrerá prejuízos em relação ao atendimento odontológico. As informações sobre cada criança retiradas de suas fichas médicas são confidenciais e sigilosas, sendo que a identidade de cada participante só será utilizada por membros da equipe da pesquisa.

É importante lembrar que os procedimentos realizados pelos próprios dentistas para coletar a saliva não causarão, de maneira alguma, dano à criança. O responsável pelo paciente poderá solicitar sua saída do estudo em qualquer momento, assim como a própria criança, e neste caso, os responsáveis pelo projeto se comprometem a não utilizar as informações obtidas.

Em caso de dúvidas ou necessidades, o responsável poderá entrar em contato com: Dra. Madeleine Souza das Chagas, na Faculdade de Odontologia da UFRJ (Departamento de Odontopediatria e Ortodontia), ou pelos telefones (21) 2562-2101 / (21) 2562-2098/ (21) 9371-9068.

Atenciosamente,

\_\_\_\_\_  
 Assinatura do Pesquisador Responsável

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

Rio de Janeiro, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
 Assinatura do Responsável

**ANEXO 3**

**FICHA CLÍNICA N°** \_\_\_\_\_  
**IDENTIFICAÇÃO**

**Data do Exame:** \_\_\_\_\_

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

Prontuário (IPPMG): \_\_\_\_\_

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

Mãe: \_\_\_\_\_ HIV (+) (-)

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

End. \_\_\_\_\_

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

Responsável: \_\_\_\_\_

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

Profissão do Responsável: \_\_\_\_\_

**1) HISTÓRIA CLÍNICA**

Classificação Clínica: \_\_\_\_\_

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

Se transmissão vertical:

Diagnóstico da infecção materna ocorreu em relação à gestação:

( ) antes ( ) durante ( ) após

Programa da Assistência à Gestante HIV+ : (S) (N)

Local: \_\_\_\_\_

Usou AZT na gestação? (S) (N) (I)

Aleitamento materno: (S) (N) (NS) duração: \_\_\_\_\_ meses

Idade em que foi identificado como soropositivo: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Classificação no diagnóstico: \_\_\_\_\_

Idade em que iniciou o acompanhamento no IPPMG: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

Médico do IPPMG responsável: \_\_\_\_\_

Manifestação inicial da infecção pelo HIV:

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

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

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

( ) atraso no desenvolvimento ( ) emagrecimento

( ) outros \_\_\_\_\_

Doenças definidoras de AIDS ou outras marcantes:

Encefalopatia pelo HIV ( ) Retinite por CMV ( ) Retinite por toxo ( )

Neurotoxo ( ) LIP ( ) Micobacteriose ( ) Tuberculose ( ) PCP ( )

DPC ( ) Infecção bacteriana grave recorrente ( )

Plaquetopenia ( )

Esofagite ( ) Miocardiopatia ( ) Herpes Zoster ( )

Outras: \_\_\_\_\_

Faz uso de antiretroviral: ( ) S ( ) N

Qual?

( ) AZT ( ) 3TC ( ) ddl ( ) d4T ( ) ddC ( ) Abacavir  
 ( ) Efavirenz ( ) Delavirdina ( ) Nevirapina ( ) Saquinavir  
 ( ) Indinavir ( ) Ritonavir ( ) Nelfinavir ( ) Amprenavir

Posologia: \_\_\_\_\_

Ouros: \_\_\_\_\_

Tempo: \_\_\_\_\_

## 2) EXAME ORAL

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

Qual: \_\_\_\_\_

Tecidos Moles:

Extra 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: \_\_\_\_\_

Eritema Linear Gengival: ( ) S ( ) N

local: \_\_\_\_\_

Queilite angular: ( ) S ( ) N

Gengivite: ( ) S ( ) N

dentes: \_\_\_\_\_

Retração gengival: ( ) S ( ) N

dentes: \_\_\_\_\_

Abscesso gengival: ( ) S ( ) N

dentes: \_\_\_\_\_

Fístula: ( ) S ( ) N

dentes: \_\_\_\_\_

Periodontite: ( ) S ( ) N

Estomatite herpética: ( ) S ( ) N

Herpes labial: ( ) S ( ) N

Leucoplasia Pilosa: ( ) S ( ) N

Sarcoma de Kaposi: ( ) S ( ) N

Úlcera aftosa: ( ) S ( ) N

Outros: \_\_\_\_\_

Exame dentário  
CPOD / ceo e CPOS / ceos:

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

Nº. de lesões cavitadas ativas em dentina: \_\_\_\_\_

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

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

### 3) EXAMES LABORATORIAIS

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



## ANEXO 4

**Avaliação da amostra**

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

Ficha N°: \_\_\_\_\_

N°. do prontuário (IPPMG): \_\_\_\_\_

**MUCOSA BUCAL**Número de ufc:

Baseline:

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

15 dias após a finalização dos procedimentos odontológicos:

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

Classificação: fraco (< 10 colônias)  
 moderado (entre 11 e 49 colônias)  
 forte (> 50 colônias)

**DENTINA CARIADA**

Baseline:

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

Classificação: ausente = 0  
 muito escassa = 1 (<10 colônias)  
 escassa = 2 (10-10<sup>2</sup> colônias)  
 moderada = 3 (10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup> colônias)  
 numerosa = 4 (> 10<sup>3</sup> colônias)

Legenda:

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





# 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](#)