



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Periodontia)

ÁTILA VINÍCIUS VITOR NOBRE

Impacto do tratamento periodontal não-cirúrgico no perfil clínico e imunológico e na colonização oral por *Candida spp* em indivíduos infectados pelo HIV com periodontite crônica

PG.PERIO
FOPR - USP

RIBEIRÃO PRETO

2018

ÁTILA VINÍCIUS VITOR NOBRE

Impacto do tratamento periodontal não-cirúrgico no perfil clínico e imunológico e na colonização oral por *Candida spp* em indivíduos infectados pelo HIV com periodontite crônica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção de título de Mestre em Odontologia (Periodontia).

Área de concentração: Periodontia
Orientadora: Profa. Dra. Ana Carolina Fragoso Motta

RIBEIRÃO PRETO

2018

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Nobre, Átila Vinícius Vitor

Impacto do tratamento periodontal não-cirúrgico no perfil clínico e imunológico e na colonização oral por *Candida spp* em indivíduos infectados pelo HIV com periodontite crônica / orientadora Ana Carolina Fragoso Motta. Ribeirão Preto - São Paulo, 2018.

142 p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Periodontia.

Orientador: Motta, Ana Carolina Fragoso.

1. HIV. 2. Periodontite crônica. 3. Tratamento periodontal. 4. *Candida spp*. 5. Citocinas inflamatórias. 6. Células inflamatórias. 7. Fluido crevicular gengival.

FOLHA DE APROVAÇÃO

NOBRE, Átila Vinícius Vitor

Título: Impacto do tratamento periodontal não-cirúrgico no perfil clínico e imunológico e na colonização oral por *Candida spp* em indivíduos infectados pelo HIV com periodontite crônica.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Odontologia (Periodontia).

Aprovado em: ____ / ____ / 2018

Banca Examinadora

Prof. (a). Dr. (a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. (a). Dr. (a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. (a). Dr. (a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. (a). Dr. (a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. (a). Dr. (a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família:

Aos meus pais, a quem devo tudo, e que fizeram o possível e impossível para que eu pudesse realizar mais este sonho, muitas vezes abdicando dos seus próprios sonhos e objetivos para que eu pudesse alcançar os meus. Valderi e Tereza, vocês são minha inspiração, muito obrigado por me apoiarem em todas as minhas decisões e por me ampararem sempre que eu precisei. Muito obrigado por serem estes exemplos de seres humanos, dignos, honestos, íntegros, dentre tantas outras qualidades, que eu espero ter herdado. Amo vocês incondicionalmente.

Especialmente *à minha mãe*, que é o maior exemplo de dedicação e amor aos filhos. Mãe, muito obrigado por todo amor, carinho, preocupação e generosidade da senhora para comigo. Tudo o que eu sou, reflete na educação que a senhora me deu e nos exemplos que eu tenho em casa. Muitas vezes eu me senti sozinho e desprotegido por estar longe da senhora, mas a cada ligação e palavra de amor, ganhei forças para continuar e lutar pelos meus objetivos. Muito obrigado por tudo.

Especialmente *ao meu pai*, que sem dúvidas, é o maior incentivador da minha carreira e o meu maior exemplo de profissional completamente apaixonado pelo seu trabalho. Pai, dedico este trabalho especialmente a você, que me mostra todos os dias que apenas o conhecimento e o trabalho dignificam o homem. Hoje entendo perfeitamente a sua dúvida sobre eu fazer pós-graduação tão longe, pois sei que o quanto o senhor valoriza o trabalho árduo, e te agradeço por ter mudado de ideia. Posso te garantir que valeu muito a pena ter ficado longe estes anos, tanto para o meu crescimento profissional, como pessoal. O orgulho que sinto por ter um pai tão maravilhoso, me faz querer devolver este orgulho de todas as maneiras que posso. Espero que eu consiga fazê-lo da melhor forma.

Ao meu irmão, Ítalo, por ser meu amigo em todas as horas, por acreditar no meu potencial e por ser este exemplo de ser humano honesto e trabalhador. Muito obrigado por todas as ligações e mensagens que me mostraram o quanto sou amado e o quanto a minha presença faz falta no dia-a-dia da nossa família. Acredito que a nossa ligação tão forte é baseada no amor que recebemos dos nossos pais e no quanto nossas diferenças somam um no outro. Eu não seria completo sem você.

Aos meus tios e tias, primos, avós e toda a família Vitor Nobre, que sei que torcem por mim à distância e que emanam força e carinho de longe para que eu consiga realizar todos os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço *a Deus*, por ser meu ponto de equilíbrio espiritual e por todas as bênçãos na minha vida, especialmente por todas as pessoas tão especiais que Ele coloca à minha volta. Agradeço também por me segurar nos momentos mais difíceis, onde eu me senti completamente desestruturado, mas foi na fé e na palavra, onde encontrei forças para continuar.

Aos meus pais, por todo o incentivo, carinho e cuidado comigo e por serem meu maior exemplo de respeito ao próximo, discrição, simplicidade e sabedoria.

À minha orientadora, Ana Carolina Fragoso Motta. Ter a oportunidade de trabalhar com você é, sem dúvidas, um aprendizado constante. Sua dedicação em tudo que faz, sua competência e seu amor à profissão são admiráveis e inspiram. Sou muito grato por todos os ensinamentos e lições que aprendi nestes dois anos com você. Muito mais do que Odontologia, eu aprendi sobre vida, respeito, trabalho e profissionalismo. Peço desculpas por todas as minhas falhas durante a pós-graduação, mas acredito que todas serviram para que eu me tornasse melhor a cada dia.

Ao prof. Dr. Alan Grupioni Lourenço, por toda ajuda e colaboração no desenvolvimento deste trabalho e pela boa convivência durante minha pós-graduação. Alan, muito obrigado pelos ensinamentos repassados e pela paciência e compreensão comigo. Levarei todas as lições que aprendi com você para a vida.

À minha companheira de trabalho, Tábata Larissa Santos Pólvora, por ter sido meu braço-direito no desenvolvimento deste trabalho. Obrigado por toda ajuda e disponibilidade em todo o meu caminho na pós-graduação e, principalmente, por ter se tornado uma amiga tão querida que está sempre disposta a ajudar. Juntos compartilhamos bons e maus momentos, que com certeza, servirão de lição para nosso crescimento profissional e pessoal.

À toda a equipe que compõe a Unidade Especial de Tratamento de Doenças Infecciosas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, em especial, aos infectologistas Dra. Karen Morejon, Dr. Henrique Dibb, Dr. Rodrigo Santana, Dra. Alda Soares, Dr. Ulisses Strogoff, às enfermeiras Amélia e Marisa, à técnica em enfermagem Cláudia, à assistente social Lígia, ao sr. Francisco (recepção) e à cirurgiã-

dentista Ana Laura. Muito obrigado pela acolhida na UETDI, por sempre me tratarem com atenção e respeito e por me ajudarem na triagem dos pacientes para minha pesquisa. Dra. Karen e Dr. Ulisses, em especial, meu muito obrigado por tudo. Cláudia, Amélia e Marisa, sempre dispostas a ajudar e a tirar minhas dúvidas, sou muito grato a vocês. Lígia, muito obrigado por me ajudar a “rastrear” os pacientes. Você foi muito importante! Sr. Francisco, sempre bem-humorado e disposto a ajudar, muito obrigado. Ana Laura, muito obrigado por toda a sua ajuda nesta pesquisa, por me referenciar pacientes e ajudar na busca de informações.

Aos meus colegas de Mestrado: Renata Cardoso, Pedro Henrique Félix, Cristhiam Hernandez, Yasmin Simões Dal’Acqua, Marília Lemos Reis, Uislen Cadore e Kléber Tanaka, por todo o companheirismo durante a pós-graduação, pela convivência em harmonia que tivemos, pelos dias de estudo, ajudas nos seminários, conselhos e principalmente, a amizade e admiração que criamos um pelo outro.

Aos alunos de Doutorado: Luiz Fernando Ferreira, Sérgio Lago, Catarina Tahim, Karine Figueiredo, André Moreira, Gustavo Apolinário, Felipe Torres, Mariana Sales e Kelly Vargas. Pessoal, muito obrigado por toda ajuda e pelo bom convívio no decorrer desses anos. Em especial quero agradecer a uma colega que se tornou uma grande amiga, *Kelly*, sou muito grato pela sua amizade e por ter sido uma das primeiras pessoas a me acolher na PG-PERIO. Levarei comigo todos os bons momentos que vivemos na FORP, no Verona e em Ribeirão Preto.

Em especial aos amigos Renata Cardoso, Pedro Henrique Félix e Cristhiam Hernandez. Me faltam palavras para descrever a importância que vocês tiveram nesta fase da minha vida. Vocês foram a minha família em Ribeirão Preto, e apesar das nossas diferenças, eu serei eternamente grato a Deus por ter cruzado nossos caminhos. Muito obrigado, de coração, por todas as palavras de incentivo, por cada momento de descontração, pelos conselhos e ajudas e por todo apoio dado a mim.

À minha dupla Renata Cardoso, que foi minha companheira desde o processo seletivo, foi minha dupla de clínicas e tornou-se uma grande amiga que tenho certeza que levarei para a vida toda. Renata, muito obrigado por tudo que você fez por mim. Muitas vezes me questiono se eu teria conseguido passar por esta pós-graduação sem você. Compreensiva, humilde, dedicada,

prestativa, e acima de tudo, um ser humano iluminado. Tenho certeza do seu sucesso profissional.

Aos professores da pós-graduação em Periodontia da FORP-USP: Prof. Dr. Sérgio Scombatti, Prof. Dr. Michel Reis Messoro, Prof. Dr. Mário Taba Jr, Prof. Dr. Arthur Belém Novaes, Profa. Dra. Flávia Furlaneto e Profa. Dra. Daniela Bazan Palioto, muito obrigado por todos os ensinamentos transmitidos que me fizeram ter mais certeza do meu amor pela Periodontia e por serem exemplos de professores que eu pretendo seguir.

Às funcionárias do Departamento de Cirurgia BucoMaxiloFacial e Periodontia da FORP-USP: Daniela, Dulce e Isabel. Meninas, muito obrigado por tudo. Sempre atenciosas e dispostas a ajudar.

Em especial, *Isabel Gobbo Simonetti*, que sempre me tratou com um carinho especial e sempre estava disposta a ajudar no que eu precisasse.

Aos professores do Departamento de Estomatologia, Saúde Coletiva e Odontologia legal (DESCOL): Prof. Dr. Cristhiano de Oliveira, Prof. Dr. Luiz Carlos Pardini e Prof. Dr. Jorge Esquiche León: Aos professores Cris e Pardini, o meu muito obrigado por me acolher tão bem no departamento e principalmente ao prof. Jorge pelos valiosos ensinamentos nos seminários durante a minha monitoria voluntária na disciplina de Diagnóstico.

Aos funcionários e alunos de pós-graduação do laboratório de Histopatologia: Kléber, Adriana, Regiane e Jéssica. Gostaria de agradecer toda ajuda dos técnicos de laboratório Kléber e Adriana, sempre dispostos a ajudar. À disponibilidade da Jéssica Luana, em ter processado as amostras de gengiva coletadas da pesquisa (Obrigado, Jéssica!) e pela boa convivência no laboratório de histopatologia da FORP-USP e à Rê, por estar sempre disposta a me ajudar no que eu precisasse.

Ao técnico do laboratório de Biologia Oral, Gilberto André e Silva. Gilberto, dentre todas as pessoas que conheci na USP, você, sem dúvidas, está entre as melhores. Sempre solícito e disposto a ajudar e ensinar no que fosse preciso. Quero te agradecer por tudo que você fez por mim e por todas as ajudas na execução deste trabalho. Você foi peça fundamental para que tudo isso acontecesse. Se todos trabalhassem com o prazer que você trabalha, tudo seria mais fácil.

À profa. Dra. Marilena Chinali Komesu, que apesar de não termos tido muita convivência, eu, em particular, sou fã pela criação do Serviço DAPE (Desmistificando o Atendimento à Pacientes Especiais), o qual eu tive a honra de colaborar por mais de 1 ano e pelo trabalho desenvolvido na FORP-USP. Agradeço por permitir o uso de seu laboratório onde eu pude executar toda a pesquisa e outras pesquisas subsequentes. Muito obrigado, profa. Marilena!

A todos os participantes e ex-participantes do serviço DAPE e usuários da clínica de Pacientes Especiais: Dra. Carol Torres, Prof. Dr. Cristiano Nakao, Profa. Dra. Cláudia Helena Lovato, Dra. Jaciara, Dani, Fátima e a querida Ditinha. Muito obrigado por me permitirem conviver com vocês durante meu estágio no DAPE, e por me acolherem tão bem neste serviço e nesta clínica que são de um valor imensurável para a FORP-USP e para a comunidade.

Aos professores do Departamento de Materiais Dentários e Prótese (DMDP): prof. Dr. Cássio Nascimento, prof. Dra. Cláudia Helena Lovato e profa. Dra. Camila Tirapeli. Prof. Cássio, muito obrigado por todos os ensinamentos e por ter me recebido tão bem em seu laboratório de Diagnóstico Molecular. Prof. Cláudia, muito obrigado pela boa convivência e por todos os ensinamentos valiosos durante as clínicas que compartilhamos. Profa. Camila, muito obrigado por disponibilizar seus alunos para me ajudar nesta pesquisa e obrigado pelas boas conversas durante as reuniões que participamos juntos.

À professora Maria da Conceição Pereira Saraiva, a “Conce”. Conce, muito obrigado pela contribuição na estatística deste trabalho e toda sua disponibilidade, sempre me atendendo com a maior atenção e garantia de uma boa conversa. Quero te dizer que você se tornou uma amiga a quem eu admiro muito por toda história de vida e dedicação ao trabalho e com certeza levarei todos os ensinamentos transmitidos na sua sala para a vida toda. Muito obrigado pelos cafés, pelos almoços, pelas caronas e por me responder no whatsapp toda hora que eu precisava.

Às funcionários da clínica de pós-graduação em Periodontia da FORP-USP: Daniela Steter, Renata e Joana. Meninas, muito obrigado por ser tão solícitas a nós, alunos de pós-graduação, especialmente aos que vêm de fora e precisam entender em pouco tempo a complexidade dos trâmites das clínicas USP. Agradeço em especial a Dani, pela maravilha de convivência na clínica nestes 2 anos, por puxar minha orelha sempre que preciso e por ter se tornado uma grande amiga que eu levarei para o resto da vida.

Ao prof. Dr. Sérgio Salvador e a técnica do laboratório de microbiologia Marina Del'Arco:

Prof. Sérgio, muito obrigado por me permitir aprender microbiologia com o senhor e obrigado por ter aceitado o convite para participar do nosso projeto Líquen plano x probióticos. Marina, muito obrigado pelos ensinamentos na cultura do probiótico e por ser tão atenciosa e disposta a ajudar.

Aos funcionários da pós-graduação da FORP-USP: Mary Possani e Carlos Feitosa pelos lembretes de datas importantes e por todas as informações repassadas aos alunos de pós-graduação.

A todos os funcionários da FORP-USP: Milla Sprone (laboratório de biologia molecular), Verinha e Fátima (clínica 1), José e Clélia (clínica 2), Silvinha (clínica 3), Ana Cláudia e Karina (recepção), China e Sérgio (esterilização). Meu muito obrigado pelo trabalho desempenhado por vocês com tanta competência e por facilitarem a vida dos alunos diariamente.

À todas as funcionárias de serviços gerais, em especial a Dilza. Muito obrigado por tudo.

À toda a Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, por ter se tornado a minha segunda casa, onde eu obtive crescimento científico imensurável de grande importância para a minha vida profissional.

Ao Cnpq, pela concessão de bolsas de Mestrado, essenciais para nossa estadia e dedicação exclusiva.

Aos amigos Rinaldo Eduardo e Pedro Sampaio. Sou muito grato a Deus por todas as pessoas maravilhosas que Ele coloca na minha vida, e vocês, sem dúvidas, estão entre elas. Muito obrigado pelo convívio em harmonia no apartamento e por terem se tornado irmãos. Levarei esta amizade comigo para sempre.

Aos amigos do Ceará que mesmo distantes se fazem presentes por meio de ligações e mensagens, em especial, Plínio Fernandes, Isabela Lima, João Júnior, Thayanna Lis, Ana Luiza

Salviano, Tamires Carneiro, Éric Teixeira, Cláudio Costa, Paloma Gomes, Ingrid Bandeira, Emanuel Araújo, Taís Araújo, Gislanne Maia, Regiany Martins: AMO VOCÊS!

Aos colegas da graduação, que até hoje se fazem presentes na minha vida, em especial Glívia Queiroz, Raquel Fernandes, Felipe Fabrício, Aires Figueiredo, Roque Neto, Eldon Saraiva e Tiago Soares.

À minha ex-colega de graduação e futura Mestre em Dentística, Glívia Queiróz, que é como uma irmã para mim, com quem eu posso contar em todas as situações, mesmo que extremas, e que sei que tem um grande carinho por mim. Amo muito você, Glívia!

A todos que, direta ou indiretamente, participaram ou contribuíram para a execução deste trabalho ou participaram do meu crescimento profissional e pessoal nestes 2 anos, o meu muito obrigado.

“Nada nessa vida é fácil. Nada chega de bandeja, da mesma forma como milagres simplesmente não caem do céu. É preciso querer. É preciso desejar com todas as forças. É preciso fé. Mas, além disso, é preciso agir. É preciso lutar, correr atrás dos seus sonhos e ideais de vida. Por isso digo: se você quer paz, prepare-se para a guerra. Posso afirmar que a minha guerra ainda vai durar, perdurar por bastante tempo. Mas acredito que uma das batalhas está sendo vencida. Uma, dentre as muitas que compõem essa guerrilha chamada vida. Todas as coisas boas valem pelo desafio e pela espera. O fácil enoja. O comum não atrai. O conquistado tem muito mais valor”

(Autor desconhecido)

RESUMO

NOBRE, A. V. V. **Impacto do tratamento periodontal não-cirúrgico no perfil clínico e imunológico e na colonização oral por *Candida spp* em indivíduos infectados pelo HIV com periodontite crônica.** 2018. 142 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A introdução da terapia antirretroviral (TARV) causou impacto significativo na qualidade de vida e controle de infecções oportunistas em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), desta forma é crescente o interesse no estudo de doenças orais crônicas na era pós-TARV, com destaque para a periodontite crônica (PC). Foi avaliado o efeito da terapia periodontal não-cirúrgica (TPNC) nos parâmetros clínicos periodontais, perfil de citocinas salivares e no fluido crevicular gengival (FCG) e na colonização oral por *Candida spp* em indivíduos infectados pelo HIV com PC, por meio de um estudo quase-experimental. Indivíduos infectados pelo HIV (grupo teste) e não-infectados pelo HIV (grupo controle), ambos com PC foram avaliados. Os seguintes parâmetros foram analisados (1) clínicos, (2), imunológicos e (3) e microbiológicos: 1) índice gengival (IG), profundidade de sondagem (PS), nível de inserção clínica (NIC) e número de dentes; 2) níveis de linfócitos T CD4+ e carga viral plasmática (apenas para o grupo teste), níveis salivares de interleucina (IL)-6, IL-8 e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e níveis no FCG de lactoferrina (Lf) e histatina-5 (Hst-5), e 3) colonização oral por *Candida spp*. Os parâmetros foram analisados em três diferentes tempos (tempo 0 = baseline; tempo 2 = 30 dias após TPNC e tempo 3 = 90 dias após TPNC). A contagem de linfócitos T CD4+ e carga viral foi realizada em amostras de sangue dos pacientes do grupo teste, as ILs, Lf e Hst-5 foram dosadas por Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) e a contagem e classificação de *Candida spp* foram determinadas a partir de amostras de enxaguado bucal. Nas comparações entre grupos por tempo, ambos apresentaram redução de IG ($p < 0,0001$), PS ($p < 0,0001$), bem como ganho de inserção clínica ($p < 0,0001$) e houve aumento na contagem de linfócitos T CD4+ ($p = 0,0120$) para o grupo teste. A quantificação da carga viral variou ($p = 0,2984$), embora tenha ocorrido diminuição de alguns “outliers” iniciais com valores altos. Em relação aos biomarcadores, não foi possível observar diminuição estatisticamente significativa com o tempo para IL-6 ($p = 0,6879$), IL-8 ($p = 0,0557$), TNF- α ($p = 0,7013$), Lf ($p = 0,8188$) e Hst-5 ($p = 0,1780$) embora o declínio para IL-8 tenha sido mais acentuado. Pôde-se observar uma tendência de aumento entre o tempo 0 e tempo 2, seguido de

diminuição no tempo 3 para os grupos teste e controle da IL-8 e Hst-5, em contraste com o declínio linear para o grupo controle da IL-6. As concentrações de Lf apresentaram padrão de aumento do tempo 0 ao tempo 2 e diminuição do tempo 2 ao tempo 3 para o grupo teste, ao contrário do grupo controle, que diminuiu do tempo 0 ao tempo 2 e diminuiu do tempo 2 ao tempo 3. A análise de *Candida spp* foi dicotomizada entre os grupos teste e controle e mostrou diminuição significativa ao longo dos tempos para ambos os grupos ($p < 0,0001$). Pode-se concluir que a TPNC teve impacto benéfico nos marcadores sistêmicos da infecção pelo HIV e nos níveis de IL-8 salivar, além de reduzir a colonização oral por *Candida spp* em ambos os grupos.

Palavras-chave: HIV, periodontite crônica, tratamento periodontal, *Candida spp*, citocinas inflamatórias, células inflamatórias, fluido crevicular gengival.

ABSTRACT

ABSTRACT

NOBRE, A. V. V. **Impacto do tratamento periodontal não-cirúrgico no perfil clínico e imunológico e na colonização oral por *Candida spp* em indivíduos infectados pelo HIV com periodontite crônica.** 2018. 142 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

The introduction of antiretroviral therapy (ART) has had a significant impact on the quality of life and control of opportunistic infections in individuals infected by the human immunodeficiency virus (HIV), thus increasing interest in the study of chronic oral diseases in the post-ART era, with emphasis on chronic periodontitis (CP). The effect of non-surgical periodontal therapy (NSPT) on periodontal clinical parameters, salivary cytokine profile and gingival crevicular fluid (GGF), and oral colonization by *Candida spp* in HIV-infected individuals with CP was evaluated by means of a study quasi-experimental. Individuals infected with HIV (test group) and non-HIV infected (control group), both with CP were evaluated. The following parameters were analyzed: (1) clinical, (2) immunological, (3) and microbiological: 1) gingival index (GI), probing depth (PD), clinical attachment level (CAL) and number of teeth; 2) levels of CD4+ T lymphocytes and plasma viral load (only for the test group), salivary levels of interleukin (IL) -6, IL-8 and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and levels of lactoferrin (Lf) and histatin-5 (Hst-5), and 3) oral colonization by *Candida spp*. The parameters were analyzed at three different times (time 0 = baseline, time 2 = 30 days after NSPT and time 3 = 90 days after NSPT). The CD4+ T lymphocyte count and viral load were performed on blood samples from the patients in the test group, ILs, Lf and Hst-5 were dosed by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and the counting and classification of *Candida spp* were determined from oral rinse samples. In the comparisons between groups by time, both presented reduction of IG (p <0.0001), PD (p <0.0001), as well as clinical attachment gain (p<0.0001) and there was an increase in CD4+ T lymphocyte count (p=0.0120) for the test group. The viral load quantification varied (p=0.2984), although some initial outliers with a high value decreased. Regarding to the biomarkers, it was not possible to observe statistically significant decrease with time for IL-6 (p = 0.6779), IL-8 (p = 0.0557), TNF- α (p = 0.8188) and Hst-5 (p = 0.1780) although the decline for IL-8 was more pronounced. A tendency to increase between time 0 and time 2, followed by decrease in time 3 for the test and control groups of IL-8 and Hst-5, could be observed in contrast to the linear decline for the control group of IL-6.

Lf concentrations showed a pattern of increase from time 0 to time 2 and decrease from time 2 to time 3 for the test group, unlike the control group, which decreased from time 0 to time 2 and decreased from time 2 to time 3. *Candida spp* analysis was dichotomized between the test and control groups and showed a significant decrease over time for both groups ($p < 0.0001$). It can be concluded that NSPT had a beneficial impact on the systemic markers of HIV infection and on salivary IL-8 levels, in addition to reducing oral colonization by *Candida spp* in both groups.

Keywords: HIV, chronic periodontitis, periodontal therapy, *Candida spp*, inflammatory cytokines, inflammatory cells, gingival crevicular fluid.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Perfil clínico e sócio-demográfico dos pacientes teste e controle. Dados apresentados como número absoluto (N) e porcentagem (%), exceto quando indicado.....	60
Tabela 2 - Características epidemiológicas e parâmetros imunológicos do grupo teste.....	62
Tabela 3 - Parâmetros clínicos periodontais.....	65
Tabela 4 - Contagem de UFCs de <i>Candida spp</i> para os grupos teste e controle, nos diferentes tempos do estudo.....	68
Tabela 5 - Frequência de pacientes que apresentaram UFCs de <i>Candida spp</i> . Dados apresentados como número absoluto (N) e porcentagem (%)......	70
Tabela 6 - Quantificação da IL-6, IL-8 e TNF- α na saliva dos pacientes do grupo teste e controle, nos diferentes tempos do estudo. Os dados são apresentados como mediana (Q1 – Q3).....	72
Tabela 7 - Quantificação da Lf e Hst-5 no FCG dos pacientes do grupo teste e controle, nos diferentes tempos do estudo.....	72
Tabela 8 - Parâmetros clínicos periodontais ajustados por sexo, idade e número de dentes (pós-teste de Tukey-Kramer).....	111

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma demonstrando o processo de triagem e seleção de pacientes do grupo teste incluídos no estudo.....	57
Figura 2. Imagens clínicas de pacientes do grupo teste.....	59
Figura 3. Níveis de linfócitos TCD4+ nos diferentes tempos do estudo.....	63
Figura 4. Carga viral plasmática nos diferentes tempos do estudo.....	63
Figura 5. Índice gengival para grupos teste e controle, nos diferentes tempos do estudo.....	66
Figura 6. Profundidade de sondagem (mm) ao longo do estudo para grupos teste e controle (média e 95% IC calculados por modelo misto ajustado por número de dentes, sexo e idade)...	66
Figura 7. Nível de inserção clínica (mm) ao longo do estudo para grupos teste e controle (média e 95% IC calculados por modelo misto ajustado por número de dentes, sexo e idade).....	67
Figura 8. Número de dentes para grupos teste e controle nos diferentes tempos do estudo (média e 95% IC – modelo misto).....	67
Figura 9. Contagem de <i>Candida spp</i> para grupos teste e controle, nos diferentes tempos do estudo.....	68
Figura 10. Concentrações de IL-6 na saliva (ng/ml) ao longo do estudo para grupos teste e controle.....	73
Figura 11. Concentrações de IL-8 na saliva (ng/ml) ao longo do estudo para grupos teste e controle.....	73
Figura 12. Concentrações de TNF- α na saliva (ng/ml) ao longo do estudo para grupos teste e controle.....	74
Figura 13. Concentrações de Lf no FCG (pg/ml) ao longo do estudo para grupos teste e controle.....	74
Figura 14. Concentrações de Hst-5 no FCG (pg/ml) ao longo do estudo para grupos teste e controle.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP: Academia Americana de Periodontologia

AIDS: Síndrome da imunodeficiência adquirida

AZT: Zidovudina

BSA: *Bovine serum albumine*

CÉLS/MM³: Células por milímetro cúbico de sangue

DP: Desvio padrão

EC-OMS: *EC-Clearing-House* sobre problemas orais relacionados à infecção pelo HIV e Centro Colaborador da Organização Mundial de Saúde sobre manifestações orais do HIV

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

FCG: Fluido crevicular gengival

FN-kB: Fator nuclear Kappa-B

FORP: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

GI: Gastrointestinal

HC-FMRP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

HIV: Vírus da imunodeficiência humana

Hst-1: Histatina-1

Hst-3: Histatina-3

Hst-5: Histatina-5

IG: Índice gengival

IHO: Instruções de higiene oral

IL: Interleucina

IL-1 β : Interleucina 1-beta

IL-2: Interleucina-2

IL-4: Interleucina-4

IL-5: Interleucina-5

IL-6: Interleucina-6

IL-8: Interleucina-8

IL-10: Interleucina-10

IL-13: Interleucina-13

INF- γ : Interferon-gama

LF: Lactoferrina

L T CD4⁺: Linfócitos T CD4⁺

ML: Mililitros

MM: Milímetros

NIC: Nível de inserção clínica

OMS: Organização Mundial da Saúde

OPD: *o-Phenylenediamine dihydrochloride*

PBS: *Phosphate buffered saline*

PC: Periodontite crônica

PH: Potencial hidrogeniônico

PMS: Polimorfonucleares

PS: Profundidade de sondagem

PSR: Exame periodontal simplificado

RANKL: Receptor do ativador do fator nuclear Kappa-B

RAR: Raspagem e alisamento radicular

TARV: Terapia antiretroviral

TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido

TGF- β : Fator de crescimento transformador-beta

TH: Linfócitos T helper

TH0: Linfócitos T helper 0

TH1: Linfócitos T helper 1

TH2: Linfócitos T helper 2

T NAÏVE: Linfócitos T naive

TNF- α : Fator de necrose tumoral-alfa

TPNC: Terapia periodontal não-cirúrgica

TREG: Linfócitos T regulatórios

UBS: Unidade Básica de Saúde

UETDI: Unidade Especial de Tratamento de Doenças Infecciosas

UFC: Unidade formadora de colônia

UNAIDS: Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS

USP: Universidade de São Paulo

WHO: *World health organization*

LISTA DE SÍMBOLOS

%: Por cento

\leq : Menor ou igual a (símbolo matemático)

\geq : Maior ou igual a (símbolo matemático)

$>$: Maior a (símbolo matemático)

$<$: Menor a (símbolo matemático)

$=$: Igual

n: Tamanho da amostra

P: Probabilidade de significância

$^{\circ}$: Graus Celsius

g: Aceleração da gravidade

μl : Microlitros

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A: Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética.....	100
ANEXO B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	102
ANEXO C: Exame anamnésico.....	106
ANEXO D: Tabela 8. Parâmetros clínicos periodontais ajustados por sexo, idade e número de dentes (pós-teste de Tukey-Kramer).....	112
ANEXO E: Artigo científico submetido ao para publicação no periódico Journal of Periodontology.....	113

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	35
2 OBJETIVOS.....	43
2.1 Objetivos gerais	43
2.2 Objetivos específicos	43
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
3.1 Aspectos éticos	45
3.2 Seleção de pacientes	45
3.3 Delineamento do estudo.....	46
3.4 Calibração do operador	46
3.5 Anamnese.....	48
3.6 Exame físico intra e extraoral	48
3.7 Parâmetros clínicos periodontais	49
3.8 Coleta das amostras	50
3.8.1 Coleta de saliva	50
3.8.2 Coleta de fluido crevicular gengival (FCG).....	50
3.8.3 Coleta de enxaguado bucal.....	51
3.9 Terapia periodontal não-cirúrgica.....	51
4 ANÁLISES LABORATORIAIS.....	52
4.1 Contagem oral de <i>Candida spp</i>	52
4.2 Dosagem de IL-6, IL-8 e TNF- α na saliva.....	52
4.3 Dosagem de lactoferrina e histatina no FCG	53
5 Análise estatística	54
5 RESULTADOS	56
5.1 Pacientes	56
5.1.2 Perfil clínico e sócio-demográfico	58
5.1.3 Características epidemiológicas e parâmetros imunológicos do grupo teste	61
5.2 Monitoramento clínico.....	64
5.3 Contagem oral de <i>Candida spp</i>	68
5.4 Espécies de <i>Candida spp</i>	69
5.5 Monitoramento imunológico	71
6 DISCUSSÃO.....	77
7 CONCLUSÃO.....	85

REFERÊNCIAS	87
ANEXOS	99

1 INTRODUÇÃO

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) é o estágio avançado da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), e continua a ser um dos principais problemas de saúde pública global (WHO, 2016). De acordo com o Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS (UNAIDS), existem 36,7 milhões de pessoas vivendo com o HIV em todo o mundo, 20,7 milhões de pessoas que vivem com HIV recebendo tratamento, 1,8 milhões de novas infecções pelo HIV, e 1,2 milhões de mortes relacionadas à AIDS (UNAIDS, 2017). No Brasil, desde o início da epidemia da AIDS (em 1980) até junho de 2017, foram identificadas 882.810 pessoas vivendo com o HIV, 316.088 óbitos tendo a infecção pelo HIV/AIDS como causa básica, e estima-se que tenham ocorrido aproximadamente 40.000 novas infecções por ano, nos últimos cinco anos (BRASIL, 2017). Diante deste elevado número de casos, a investigação sobre os fatores relacionados à infecção pelo HIV torna-se cada vez mais emergente no cenário da pesquisa científica.

O advento da terapia antirretroviral (TARV), em 1995, reduziu significativamente as taxas de mortalidade devido a causas relacionadas ao HIV, resultando na restauração e preservação das funções imunológicas e consequente aumento na expectativa de vida destes pacientes (PALLELA et al., 1998; GAMA et al., 2016; DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2017; HERON & ELAHI, 2017). Considerado complexo e associado a uma série de efeitos adversos, atualmente os regimes antirretrovirais são fáceis de administrar, seguros e bem tolerados, e consistem na associação de três ou quatro fármacos, incluindo os inibidores de transcriptase reversa análogos de nucleosídeos e não-análogos de nucleosídeos, inibidores de protease e inibidores de integrase (JHONSON et al., 2002; DEEKS, 2011). O Brasil tem uma das maiores coberturas de TARV entre os países de baixa e média renda, com mais da metade da população (64%) infectada pelo HIV recebendo TARV gratuitamente, segundo os dados mais atuais do Ministério da Saúde (BRASIL, 2017). A substancial melhora atribuída ao uso de TARV na qualidade de vida destes indivíduos pôde ser estendida para a cavidade oral, pela diminuição de doenças orais relacionadas ao HIV, entretanto ainda existe grande interesse no estudo de manifestações orais associadas à infecção pelo HIV/AIDS, por estas serem excelentes marcadores de imunossupressão (LOURENÇO et al., 2008; MATAFSI; SKOURA; SAKELLARI, 2011).

De acordo com os critérios de diagnóstico propostos pelo *EC-Clearing House* sobre problemas orais relacionados à infecção pelo HIV e Centro Colaborador da Organização Mundial de Saúde (EC-OMS), as lesões fortemente associadas à infecção pelo HIV são:

candidíase, leucoplasia pilosa, sarcoma de Kaposi e doenças periodontais. Dentre as doenças periodontais associadas à infecção pelo HIV, as doenças periodontais necrosantes (gengivite e periodontite necrosantes) e o eritema gengival linear são as manifestações clássicas (PATTON et al., 2000; GAITÁN-CEPEDA et al., 2008). O curso destas patologias foi significativamente alterado após o estabelecimento de TARV e, conforme a infecção pelo HIV se tornou uma doença crônica, as doenças inflamatórias orais crônicas, tornaram-se alvo de grande interesse de estudo, com destaque para a periodontite crônica (MATAFSI; SKOURA; SAKELLARI, 2011).

Periodontite é uma doença inflamatória crônica, causada primariamente por bactérias, que afeta os tecidos de sustentação dos dentes (ligamento periodontal, cemento e osso alveolar). A forma mais comum desta doença é a periodontite crônica, que acomete mais de 700 milhões de pessoas em todo o mundo, e é uma das principais causas de perda dentária (OLIVER; BROWN; LOE, 1998; NOGUERA-JULIAN et al., 2017). A patogênese da periodontite crônica está relacionada com a presença de uma microbiota disbiótica, enriquecida com bactérias anaeróbias gram-negativas, que têm a capacidade de influenciar o sistema imunológico do hospedeiro e causar o desequilíbrio na comunidade simbiótica saudável, resultando na secreção de mediadores inflamatórios envolvidos na destruição periodontal (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1992; LAMONT & HAJISHENGALLIS, 2015). Evidências sugerem que a periodontite crônica gera resposta inflamatória sistêmica, considerada fator de risco para o agravamento de várias doenças/condições sistêmicas, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes mellitus, artrite reumatóide, e a infecção pelo HIV (WILLIAMS & OFFENBACHER, 2000; RYDER; NITTAYANANTA; COOGAN, 2012).

Sabe-se que a imunossupressão no indivíduo infectado pelo HIV, em combinação com outros fatores do hospedeiro oferece risco adicional para a perda de inserção periodontal (BARR et al., 1992; MATAFSI; SKOURA; SAKELLARI, 2011; BERBERI & NOUJEIM, 2015). É relatada associação entre a redução na contagem de linfócitos TCD4+ para valores inferiores a 200 células por milímetro cúbico de sangue (cél/mm³) e aumento na viremia plasmática – fase aguda da infecção pelo HIV ou AIDS – e a destruição periodontal (KINANE et al., 1999; ALPAGOT et al., 2004). Estes parâmetros imunológicos auxiliam na avaliação da progressão da infecção pelo HIV, predizem a necessidade de introdução de terapias profiláticas para infecções oportunistas e denunciam possíveis falhas na TARV (AUTRAN et al., 1999; MILLER et al., 1999).

Além dos fatores clínicos, imunológicos e bacterianos, infecções fúngicas se instalam facilmente na cavidade oral de indivíduos infectados pelo HIV, em virtude das alterações na

função imunológica mediada por linfócitos T (LIMA; SILVEIRA; BIRMAN, 1994). A maioria das infecções fúngicas orais são causadas por fungos do gênero *Candida spp*, que possui relação comensal com a cavidade oral, mas que assumem características de patogenicidade devido a imunossupressão (EGGIMANN; GARBINO, PITTET, 2003). A candidíase oral é um problema particularmente comum em indivíduos infectados pelo HIV, onde mais de 70% dos pacientes com AIDS apresentam esta manifestação ao longo da doença (NIKAWA; JIN; SAMARANAYAKE, 2002).

Alguns estudos vêm sugerindo a relação entre a presença de *Candida spp* e a patogênese da doença periodontal em indivíduos infectados pelo HIV (BARR et al., 1992; MCKAIG et al., 1998; LEITE et al., 2002). Dados publicados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram aumento de 4,8 vezes na contagem de *Candida spp* em pacientes infectados pelo HIV com doença periodontal, quando comparados aos infectados pelo HIV sem doença periodontal (LOURENÇO et al., 2017). Isso significa que a doença periodontal pode ser um fator responsável pelo aumento na contagem de *Candida spp* comensal em pacientes infectados pelo HIV, e este aumento pode predispor o paciente ao desenvolvimento de candidíase oral.

A deterioração do sistema imunológico, mesmo na vigência de TARV, é uma consequência da ativação imune crônica associada à infecção pelo HIV. Esta persistência da ativação imune pode ser resultado do dano causado à barreira gastrointestinal (GI) que ocorre nos estágios iniciais da infecção pelo HIV (SHARPSTONE et al., 1999; MACPHERSON & HARRIS, 2004). A diminuição na produção de interleucinas (IL) protetoras, em conjunto com a alta replicação viral que ocorre no trato GI, por ser um local anatômico do corpo ricamente povoado por linfócitos, afeta as junções epiteliais ao longo do trato GI (VERGNON-MISZCZYCHA et al., 2015). Isto resulta na translocação de microorganismos e seus produtos do lúmen intestinal para a lâmina própria – fenômeno denominado translocação microbiana – que mantém o dano à barreira GI e estimula o sistema imunológico sistêmico (ZEVIN et al., 2016). A imunossupressão subsequente juntamente com a toxicidade direta do HIV, a disbiose do trato GI, a ativação imune local e a presença de reservatórios do HIV resultam em ambiente pró-inflamatório generalizado que pode exacerbar a doença periodontal pré-existente (BRENCHLEY & DOUEK, 2008; SANTOS-OLIVEIRA et al., 2013).

O processo inflamatório observado na periodontite crônica ocorre como resultado da exposição dos tecidos periodontais a estímulos prejudiciais de periodontopatógenos e seus produtos. Embora as bactérias sejam o agente causador primário, a progressão e gravidade da doença são determinadas pela resposta do hospedeiro, e esta inflamação é mediada e/ou controlada por uma série de mediadores e reguladores extracelulares, incluindo citocinas,

quimiocinas e peptídeos (GENCO, 1992; GIANNOPOULOU, KAMMA, MOMBELLI, 2003; GONZALES, 2015). Citocinas são proteínas solúveis de baixo peso molecular, secretadas por células e que agem na sinalização intracelular, iniciando e mantendo a resposta imune e inflamatória (LINDHE; KARRING; NIKLAUS, 2005; TURNER et al., 2014). Os linfócitos TCD4⁺ ativados secretam citocinas que promovem o crescimento, diferenciação e outras funções das principais células do sistema imunológico, incluindo monócitos, macrófagos, neutrófilos, basófilos, células dendríticas, mastócitos e linfócitos T e B (GONZALES, 2015)

A associação entre doença periodontal e fatores associados à infecção pelo HIV, tais como imunossupressão, toxicidade, translocação microbiana e ativação imune tem sido extensamente investigada, com a observação de níveis elevados de linfócitos TCD4⁺ e CD8⁺ ativados, redução do repertório de linfócitos T e aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), importantes mediadores da inflamação e destruição do periodonto (TELES et al., 2009). Além disso, outros peptídeos antimicrobianos orais – os quais fazem parte do objetivo deste estudo – também podem ter papel fundamental na patogenicidade da doença periodontal em pacientes infectados pelo HIV, dentre eles, destacamos lactoferrina (Lf) e histatina. Estes eventos, associados a evidências de que as células do sistema imunológico podem ter vida útil replicativa limitada, podem acelerar mudanças no sistema imunológico, comprometendo significativamente a competência imune e fazendo com que indivíduos infectados pelo HIV apresentem características imunológicas semelhantes às observadas no processo fisiológico do envelhecimento, o que chamamos de imunossenescência (APPAY et al., 2007; DEEKS, 2011).

A infecção pelo HIV é um exemplo de desequilíbrio entre linfócitos T, cujo papel tem sido amplamente investigado na patogênese da periodontite, devido a superprodução do ligante do receptor do ativador do fator nuclear Kappa-B (RANKL) e TNF- α , mediadores fundamentais no processo de osteoclastogênese (BRUNETTI et al., 2005; FALASCA et al., 2008). Os linfócitos T (também chamados de células T) se diferenciam de acordo com sua função em: citotóxicos (CD8), auxiliares (CD4), *natural killer* (NK), de memória (CD45) e regulatórios (Treg) (TURNER et al., 2014).

Os linfócitos TCD4⁺ (ou T helper), por sua vez, são subdivididos em dois subconjuntos, de acordo com as citocinas que secretam, denominados T helper 1 (Th1) e T helper 2 (Th2). Esta diferenciação tem início quando um linfócito T naive, ou virgem, se depara com mínimo estímulo antigênico (CHEN et al., 2013). Até este momento, os linfócitos T naive, do ponto de vista funcional, apenas produzem interleucina-2 (IL-2), após um mínimo estímulo, passam a

designar-se Th0, e quando ocorre estímulo mais acentuado, acontece a diferenciação em Th1 ou Th2. O perfil linfocitário Th1 é responsável por produzir citocinas relacionadas principalmente com a resposta imune-celular, e Th2 é responsável pela geração da resposta imune-humoral (LEIGH et al., 1998; TURNER et al., 2014). As citocinas IL-2 e interferon-gama ($\text{INF-}\gamma$) promovem a diferenciação da Th1, responsável pela resposta pró-inflamatória, enquanto interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-10 (IL-10) e interleucina-13 (IL-13) promovem a diferenciação de Th2, responsável pela resposta anti-inflamatória (CHEN et al., 2013; CHENG; HUGHES; TAAMS, 2014). Neste contexto, a literatura tem relatado que o equilíbrio entre os perfis Th1 e Th2 e associado à expressão de citocinas pró-inflamatórias [interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-8, $\text{TNF-}\alpha$] e citocinas anti-inflamatórias [IL-4, IL-5, IL-10, fator de crescimento transformador-beta ($\text{TGF-}\beta$)] são considerados parâmetros de diagnóstico e prognóstico da destruição periodontal (GENCO, 1992; BIRKEDAL-HANSEN, 1993; GIANNOPOULOU, KAMMA, MOMBELLI, 2003).

IL-6 é uma citocina pleiotrópica expressa por uma série de células, incluindo macrófagos, linfócitos T, linfócitos B, células endoteliais, fibroblastos, osteoblastos e células da medula óssea (TURNER et al., 2014) com ação importante sobre a formação de osteoclastos e a reabsorção óssea na doença periodontal (JOHANNSEN et al., 2007). Baqui et al. (2000) reportaram níveis aumentados de IL-6, IL-1 β e $\text{TNF-}\alpha$ no FCG coletado a partir de bolsas periodontais profundas (>5 mm) de pacientes infectados pelo HIV com periodontite crônica. Valentine et al. (2014) verificaram impacto significativo da TPNC na diminuição dos níveis de IL-6 na saliva e concomitante aumento na taxa de linfócitos TCD4+ de pacientes infectados pelo HIV.

IL-8 é um mediador inflamatório crítico, que desempenha papel fundamental na resposta imune inata inicial à microorganismos, por meio do recrutamento de neutrófilos, migração quimiotática e ativação de monócitos, linfócitos, basófilos e eosinófilos em locais de inflamação. É produzida por fagócitos mononucleares ativados e pelas células dendríticas, e estimula a diferenciação dos linfócitos Th0 em Th1. (HAMMOND et al., 1995; TURNER et al., 2014). Tsai et al. (1995) e Mathur et al. (1996) reportaram níveis aumentados de IL-8 no FCG de sítios inflamados, em comparação com sítios periodontais saudáveis. Além disso, Tsai et al. (1995) observaram diminuição nos níveis de IL-8 no FCG após terapia periodontal em pacientes com periodontite crônica.

$\text{TNF-}\alpha$ é uma das citocinas mais importantes e pleiotrópicas que participam da resposta imune e inflamatória. É principalmente secretado por macrófagos ativados, embora também possa ser secretado por outros tipos de células, incluindo monócitos, linfócitos T, mastócitos,

células NK, queratinócitos e fibroblastos (GROEGER & MEYLE, 2015). Sua detecção salivar ou no FCG está diretamente relacionada à destruição tecidual local e tem ação sinérgica com IL-1 β na reabsorção óssea (McCAULEY & NOHUTCU, 2002; BOYCE et al., 2005; TELES et al., 2009; TURNER et al., 2014). Baqui et al. (2000) reportaram aumento de duas vezes na concentração de TNF- α no FCG em bolsas periodontais profundas (≥ 5 mm) e rasas (< 5 mm) em pacientes infectados pelo HIV em comparação com indivíduos sistemicamente saudáveis.

Em relação aos peptídeos antimicrobianos, a Lf é uma proteína que participa da defesa humoral inespecífica, e pode ser encontrada em diferentes secreções corporais, incluindo saliva, leite materno e lágrima. Esta proteína é armazenada em grânulos secundários de neutrófilos (LÖNNERDAL & IYER, 1995), pode modular a resposta inflamatória, e apresenta efeito protetor anti-HIV, reduzindo a capacidade das células dendríticas de identificar seus antígenos, além de possuir propriedades antibacterianas e antifúngicas (GROOT et al., 2005; LOURENÇO et al., 2013). Existem evidências de que a concentração de Lf no FCG mostra correlação positiva com os parâmetros clínicos da doença periodontal, onde foi observado aumento nos níveis de Lf na presença de periodontite, em comparação com sítios saudáveis (TSAI; KAO; CHEN, 1998; WEI et al., 2004; OZDEMIR et al., 2009; YADAV et al., 2014).

As histatinas são um grupo de peptídeos antimicrobianos de baixo peso molecular, ricas em histidina e secretadas pelas glândulas salivares humanas e também detectadas no soro humano (MURAMAKI et al., 2002), com poderosa ação antifúngica, principalmente contra *Candida albicans* (*C. albicans*) (HELMERHORST et al., 1997; TORRES et al., 2008). As principais proteínas da família das histatinas são as histatinas 1, 3 e 5, com histatina-1 (Hst-1) e histatina-3 (Hst-3) codificadas por dois genes, HTN-1 e HTN-3, respectivamente, e histatina-5 (Hst-5) sendo o produto proteolítico de Hst-3 (KHAN et al., 2013). Dentre as histatinas, a Hst-5 é o membro mais ativo devido seu potencial anti-*Candida spp*, particularmente em indivíduos imunocomprometidos (NIKAWA et al., 2002). Além da atividade antifúngica, impede a formação da película adquirida (fina camada que serve como base para a adesão de microorganismos, que posteriormente organizam-se em biofilmes), tem atividade bactericida e possui propriedades que estimulam a cicatrização de feridas. Apesar de mostrar redução nos sinais clínicos da inflamação gengival e na formação do biofilme, e estas características sugerirem possível participação na patogênese da doença periodontal, não foram identificadas diferenças em relação a sua concentração no FCG na presença e ausência de doença periodontal (BHADBHADE; ACHARYA; THAKUR, 2013). Ainda são escassos estudos que avaliem os níveis de Hst-5 no FCG na doença periodontal, em relação à presença da infecção pelo HIV.

Até o presente momento, os estudos sobre o perfil clínico e imunológico de pacientes infectados pelo HIV com periodontite crônica sob TARV antes e após terapia periodontal produziram resultados inconsistentes, provavelmente devido à presença de fatores de confusão, tais como: o uso prolongado de antibióticos e anti-inflamatórios, a não exclusão de doenças/condições consideradas modificadoras da doença periodontal, como diabetes mellitus, gravidez, tabagismo e fatores genéticos. Todos estes fatores podem ter efeito na progressão da doença periodontal, e certamente comprometem a avaliação dos resultados. Além disso, as formas de caracterização da doença periodontal e as diversas metodologias empregadas para registrar os parâmetros clínicos da doença periodontal também parecem influenciar os resultados destes trabalhos (DRINKARD et al., 1991; BARR; LOPEZ; RUA-DOBLES, 1992; RILEY, LONDON, BURMEISTER, 1992; ROBINSON et al., 1996; MCKAIG et al., 1998; GONÇALVES et al., 2005). Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da terapia periodontal não-cirúrgica (TPNC) no perfil de citocinas na saliva e no FCG e na colonização oral por *Candida spp*, além de estabelecer a correlação entre os parâmetros clínicos e imunológicos antes e após a TPNC.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar se a TPNC é capaz de alterar as concentrações de citocinas na saliva (IL-6, IL-8, TNF- α) e de peptídeos antimicrobianos no FCG (Lf e Hst-5), além da contagem oral de *Candida spp*, em pacientes com periodontite crônica infectados pelo HIV sob TARV, correlacionando essas possíveis alterações com a melhora clínica da doença periodontal.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar parâmetros clínicos periodontais (índice gengival – IG, profundidade de sondagem – PS, nível de inserção clínica – NIC e número de dentes) e mensurar diferenças nas características clínicas da doença periodontal, em pacientes infectados e não-infectados pelo HIV, antes e após a TPNC, comparando tais grupos entre si;
- ✓ Avaliar os níveis de citocinas IL-6, IL-8 e TNF- α presentes na saliva, e Lf e Hst-5 no FCG de pacientes infectados e não-infectados pelo HIV, antes e após TPNC;
- ✓ Avaliar a contagem de *Candida spp* em pacientes infectados e não infectados pelo HIV, antes e após a TPNC, comparando-a com os parâmetros clínicos da doença periodontal;
- ✓ Avaliar os parâmetros imunológicos da infecção pelo HIV no soro (contagem de linfócitos TCD4+ e carga viral plasmática) antes e após a TPNC, comparando-os com os parâmetros clínicos da doença periodontal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Humana (CAAE: 54415.1.000.5419) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP) – Universidade de São Paulo (USP) (ANEXO A). Todos os pacientes participantes da pesquisa foram informados detalhadamente a respeito do estudo do qual participavam (objetivos, benefícios, riscos e desconfortos), e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), confirmando por escrito sua participação (ANEXO B). Este estudo foi registrado no *ClinicalTrials.gov* (NCT03262402).

3.2 Seleção dos pacientes

Pacientes adultos (≥ 18 anos) infectados (grupo teste) e não infectados pelo HIV (grupo controle), apresentando periodontite crônica, foram selecionados para este estudo. Os pacientes infectados pelo HIV foram recrutados na Unidade Especial de Tratamento de Doenças Infecciosas (UETDI) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP), inicialmente a partir da revisão de prontuários médicos. Aqueles selecionados foram entrevistados e submetidos a exame periodontal simplificado (PSR) de triagem no consultório odontológico presente na UETDI, utilizando uma sonda periodontal da Organização Mundial de Saúde (OMS) no intuito de determinar a necessidade de tratamento periodontal (adaptado de ARMITAGE, 1999). Finalmente, os pacientes que atenderam a todos os critérios de inclusão (descritos abaixo) foram convidados a participar da pesquisa. Os pacientes não infectados pelo HIV foram selecionados a partir de casos encaminhados pelas Unidades Básicas de Saúde (UBSs) de Ribeirão Preto, para atendimento na FORP-USP.

Critérios de inclusão para os grupos teste e controle:

- ✓ Ter idade superior ou igual a 18 anos;
- ✓ Aceitar e assinar o TCLE;
- ✓ Possuir mais do que 12 dentes;

- ✓ Possuir periodontite crônica, com no mínimo dois sítios com profundidade de sondagem $\geq 5\text{mm}$ e dois dentes com perda de inserção $\geq 5\text{mm}$.

Critérios de inclusão para o grupo teste:

- ✓ Mesmos critérios descritos acima, e;
- ✓ Possuir soropositividade para o HIV, confirmada por meio do teste *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), em amostras sanguíneas distintas, confirmada por *Western Blot*;
- ✓ Apresentar contagem de linfócitos TCD4+ inferior a 200 céls/mm^3 de sangue;
- ✓ Estar em uso de TARV regular, com uso de um inibidor de transcriptase reversa análogo de nucleosídeo, um inibidor de transcriptase reversa não-análogo de nucleosídeo, um inibidor de integrase e um inibidor de protease;
- ✓ Apresentar contagem de linfócitos TCD4+ e carga viral recente (três meses antes ou três meses depois da abordagem inicial da pesquisa).

Critérios de exclusão para os grupos teste e controle:

- ✓ Ter realizado tratamento periodontal recente (seis meses antes da consulta);
- ✓ História de uso de antibióticos e anti-inflamatórios nos últimos seis meses;
- ✓ Apresentar outro envolvimento sistêmico que possa interferir na progressão da doença periodontal ou na resposta ao tratamento, como gestação, diabetes mellitus, hipertensão ou outro estado de imunossupressão;
- ✓ Estar em tratamento ortodôntico;
- ✓ Apresentar envoltimentos protéticos extensos;
- ✓ Ser tabagista;
- ✓ Ser usuário de drogas;
- ✓ Apresentar distúrbios cognitivos ou motores que possam interferir nos cuidados de higiene oral desempenhados pelo paciente.

3.3 Delineamento do estudo

Trata-se de um modelo quase-experimental com dois grupos de estudo que foram constituídos por conveniência. Todos os pacientes selecionados foram submetidos a exame clínico-anamnésico (exame físico e anamnese) (ANEXO C), coleta de saliva total, enxaguado

bucal, FCG e tecido gengival (o último para estudos futuros), em diferentes tempos, para análises laboratoriais do estudo. O detalhamento será feito apenas para as coletas pertinentes ao presente estudo.

Tempo 0: Foram realizados exame clínico-anamnésico, coleta de saliva total, coleta de enxaguado bucal e coleta de FCG. Após as coletas, os pacientes receberam informações detalhadas sobre a etiologia da doença periodontal e instruções de higiene oral (IHO) específicas sobre técnicas de escovação adequadas para um efetivo controle de biofilme, incluindo uso de fio dental e escovas interproximais para realização de limpeza interdentária.

Tempo 1: Após 7 dias da consulta inicial, os pacientes foram submetidos a TPNC. A terapia periodontal teve início com a raspagem supragengival e, uma semana após, o debridamento subgengival – raspagem e alisamento radicular (RAR) com a utilização de instrumentos manuais (curetas de Gracey) e ultrassônicos.

Tempo 2: Após 30 dias do *Tempo 1*, os pacientes foram submetidos a exame periodontal completo de reavaliação, nova coleta de saliva total, enxaguado bucal e FCG utilizando-se a mesma metodologia do *Tempo 0*. Nova instrução de higiene oral foi realizada.

Tempo 3: Após 90 dias do *Tempo 1*, os pacientes foram novamente submetidos a exame periodontal completo de reavaliação, coleta de saliva total, enxaguado bucal e FCG. As coletas da pesquisa foram então concluídas, e os pacientes receberam alta parcial, retorno livre ou foram encaminhados para tratamento de suas outras necessidades.

3.4 Calibração do examinador

O índice Kappa foi utilizado para avaliar a calibração do examinador para coleta dos parâmetros clínicos periodontais a fim de mensurar a concordância diagnóstica. Segundo a OMS, para critérios de diagnóstico, o índice aceitável de concordância de Kappa deve ser maior ou igual a 0,85 (OMS, 1997).

Para a calibração, foram coletadas medidas duplicadas para PS e NIC de dez pacientes com periodontite crônica que não estavam relacionadas a este estudo e apresentaram pelo menos dois pares de dentes com PS \geq 5 mm em locais proximais. Esta calibração foi feita com

um intervalo de 48 horas entre o primeiro e o segundo exame. Os coeficientes de correlação intraclasse como medida da reprodutibilidade intraexaminador foram de 0,85 e 0,89 para PS e NIC, respectivamente.

3.5 Anamnese

Todos os participantes da pesquisa foram submetidos a um questionário contendo perguntas sobre suas condições médico-odontológicas (ANEXO C). Algumas questões foram dirigidas ao entrevistado, como: dados pessoais, automedicação e a história odontológica. Informações sobre tempo de soropositividade para o HIV, tempo de tratamento, ganho ou perda recente de peso, medicamentos em uso, teores de linfócitos TCD4+, de carga viral, classificação da infecção pelo HIV (CENTERS FOR DISEASE AND PREVENTION, 1993) e histórico ou presença de manifestações oportunistas, foram obtidas por meio de consulta ao prontuário médico.

3.6 Exame físico intra e extraoral

O exame físico consistiu em palpação dos linfonodos da região de cabeça e pescoço buscando alterações de volume, consistência e temperatura. No exame extraoral foram avaliadas alterações cutâneas faciais e perilabiais: comissuras labiais, lábios, nariz, região do processo zigomático da maxila e região mentual. No exame intraoral foram avaliados tecidos moles: língua, assoalho bucal, gengiva, mucosa jugal, palato duro, palato mole e tonsilas. As manifestações orais observadas foram catalogadas segundo preconizado por *EC-Clearinghouse on Oral Problems Related to HIV Infection and WHO Collaborating Centre on Oral Manifestations of the Immunodeficiency Virus, 1993*. Após o exame físico de partes moles, o paciente foi convidado a realizar a coleta de saliva total, enxaguado bucal para quantificação de *Candida spp* e FCG. Apenas após estas coletas, os pacientes eram submetidos ao exame periodontal completo.

3.7 Parâmetros clínicos periodontais

O exame periodontal foi realizado após a coleta de saliva, para evitar contaminação da amostra por sangramento gengival. Foram determinados os parâmetros: índice gengival (IG), profundidade de sondagem (PS) e nível de inserção clínica (NIC), além do número de dentes antes e após a TPNC:

Índice gengival (IG) (AINAMO & BAY, 1976): Foi medido em quatro faces por cada dente (vestibular, lingual ou palatina, mesial e distal) e expresso em porcentagem. O IG foi avaliado dicotomicamente e foi representado pela presença ou não de sangramento até 20 segundos após a sondagem da margem gengival.

Profundidade de sondagem (PS): Foi mensurada em mm, a partir da margem gengival até a base do sulco gengival ou bolsa periodontal, utilizando-se a sonda periodontal milimetrada North Caroline (Hu-Friedy, Chicago, Ill), que foi introduzida entre o dente e a gengiva paralelamente ao longo eixo do dente, respeitando-se o contorno dentário. A PS em cada tempo foi determinada pela média de PS de todos os dentes presentes na boca do paciente.

Nível de inserção clínica (NIC): Foi mensurado em mm, a partir da junção cimento-esmalte até a porção mais apical do sulco/bolsa periodontal, por meio da inserção da sonda milimetrada North Caroline paralelamente ao longo eixo do dente, respeitando-se o contorno dentário. Todos os dentes presentes (exceto os terceiros molares) foram avaliados em seis sítios: sítio mesio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual/palatino, lingual/palatino, disto lingual/palatino, e, semelhante à determinação da PS, a média de NIC em cada tempo foi determinada pela média de NIC de todos os dentes presentes na boca do paciente. O diagnóstico da periodontite crônica foi estabelecido com base na presença de pelo menos 2 sítios com $PS \geq 5\text{mm}$ e pelo menos 2 sítios com $NIC \geq 5\text{mm}$.

Número de dentes: Foi determinado o número de dentes que foram extraídos durante a TPNC, calculando-se assim o total de dentes antes e após a terapia periodontal.

3.8 Coleta das amostras

3.8.1 Coleta de saliva

No *Tempo 0*, bem como nos *Tempos 2 e 3* após a TPNC, foram coletadas amostras de saliva total. Os participantes foram instruídos a não se alimentar, não beber, não fumar e não escovar os dentes uma hora antes da coleta, de forma a minimizar os riscos de contaminação da amostra. Os participantes foram orientados a ficar sentados, com a cabeça levemente inclinada para frente, e expectorar a saliva por cinco minutos, em frasco colocado abaixo do lábio inferior. Todas as amostras foram coletadas entre oito e dez horas da manhã. O fluxo salivar foi anotado no prontuário. As amostras foram levadas imediatamente ao laboratório e centrifugadas à 4.800 g (aceleração da gravidade) por 30 minutos a 4 graus Celsius (°C). A saliva foi alicotada em criotubos e imediatamente congelada a -80°C até as análises necessárias (SCHENKELS; VEERMAN; AMERONGEN, 1995).

3.8.2 Coleta de FCG

No *Tempo 0*, bem como nos *Tempos 2 e 3* após a TPNC, foram coletadas amostras de FCG, obtido de dois sítios com PS \geq 5 mm. Na existência de vários dentes com a mesma profundidade de sondagem, foi escolhido o dente localizado em região mais anterior, visando diminuir a probabilidade de contaminação.

O biofilme supragengival dos dentes selecionados foi meticulosamente removido e os sítios foram cuidadosamente secos com jatos de ar, posteriormente isolados com roletes de algodão esterilizados. As amostras do FCG foram obtidas dos sítios utilizando tiras de papel de filtro de metilcelulose (Periopaper, Amitylle, NY, EUA). As tiras foram cuidadosamente inseridas junto à margem do sulco gengival durante 30 segundos (ZHAO et al., 2011). Em seguida, as tiras foram transferidas para tubos esterilizados do tipo Eppendorf, os quais foram hermeticamente selados com filme de parafina plástica (Parafilm M[®], Bemis NA, Wisconsin, EUA) e armazenados a temperatura de 80°C para posterior quantificação dos biomarcadores.

3.8.3 Coleta de enxaguado bucal

A contagem de *Candida spp* foi realizada nas amostras de enxaguado bucal com *phosphate buffered saline* (PBS) pela técnica descrita por Samaranayake et al., (1986). Um dia antes da coleta, foram preparados os tubos do tipo Falcon contendo 10 mililitros (ml) de PBS (pH 7,3 0,1 M) e esterilizados em autoclave. Estes tubos contendo PBS esterilizado foram acondicionados em temperatura de 4°C à 10°C até seu uso. O paciente foi convidado a realizar bochecho com 10 ml de PBS por 60 segundos e em seguida expectorar dentro de um tubo Falcon. O tubo Falcon foi acondicionado em recipiente refrigerado a 4°C, e conduzido imediatamente ao laboratório onde foi centrifugado (2000 g por 10 minutos). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o resíduo sólido depositado no fundo do tubo Falcon, ressuspenso em PBS até atingir 1 ml de solução. A partir desse 1 ml de solução obtido, foi realizada semeadura em meio de cultura, conforme descrição no item **Análises laboratoriais**.

3.9 Terapia periodontal não cirúrgica (TPNC)

Todos os pacientes foram submetidos a exame radiográfico periapical completo da boca toda. Em seguida, os pacientes foram submetidos à avaliação dos parâmetros clínicos periodontais já descritos anteriormente, sendo também realizada coleta de FCG e enxaguado bucal (*Tempo 0*). Após 7 dias, foi iniciada a TPNC.

O tratamento foi realizado por um periodontista, e consistiu em raspagem supragengival utilizando aparelhos ultrassônicos (Bob-Cat, Dentsply / Cavitron, Long Island City, NY, EUA) e polimento coronário com taças de borrachas em todos os dentes presentes na cavidade oral. Após 7 dias da raspagem supragengival, era realizado o debridamento subgengival – RAR – sob anestesia local. A instrumentação foi realizada utilizando curetas Gracey (Hu-Friedy, Chicago, Ill), aparelhos ultrassônicos e, se necessário, brocas multilaminadas para acabamento e polimento das superfícies dentárias. A instrumentação foi realizada quadrante por quadrante, até adequado debridamento da área e alisamento radicular, o qual foi verificado com auxílio de uma sonda exploradora número (nº) 5. Em média, o tratamento de toda a cavidade oral foi completado em quatro sessões (sessões de 50 minutos).

Após a TPNC, todos os pacientes foram incluídos em programa de terapia periodontal de suporte composto por controle de biofilme supragengival profissional e reforço de IHO

mensalmente, e depois a cada 3 meses. A terapia periodontal de suporte também incluiu atualização das histórias médicas e dentárias, e exames intra e extraoral.

4. Análises laboratoriais

4.1 Contagem oral de *Candida spp*

A análise micológica para *Candida spp* foi realizada utilizando-se o enxaguado bucal, conforme descrito no item **Coletas das amostras**. As amostras de enxaguado foram diluídas em PBS, a fim de obter três diferentes concentrações: amostra pura; amostra diluída dez vezes; e, amostra diluída cem vezes. Cem microlitros de cada diferente concentração de amostras obtidas foram semeadas em placas de Petri de cultura com Agar Sabouraud Dextrose com Cloranfenicol e incubadas em estufa de cultura à 37°C por 48 horas. As culturas positivas foram contadas para determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC/ml). Das suspensões obtidas, foram semeadas 0,1 ml ou 100 microlitros (μ l) em CHROMagar (CHROMagar, Microbiology, Paris – França) em duplicata. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Após crescimento das colônias de *Candida spp*, foi feita a identificação presuntiva das espécies baseada na morfologia e cor das colônias: verde (*C. albicans*); e, azul metálico, rosa e branca (*Candida não-albicans*).

4.2 Dosagem de IL-6, IL-8 e TNF- α na saliva

Os níveis salivares de IL-6, IL-8 e TNF- α foram determinados por ELISA do tipo *sandwich*. Para o preparo da placa de ELISA, realizaram-se diluições do anticorpo de captura policlonal, para IL-6 (antigen-affinity purified goat anti-hIL-6 + 2,5mg D-mannitol), IL-8 (antigen-affinity purified rabbit anti-hIL-8 + 2,5mg D-mannitol) e TNF- α (antigen-affinity purified rabbit anti-hTNF- α + 0,5mg D-mannitol) com PBS para uma concentração de 100 μ g/ml (para IL-6 e IL-8) e 1 μ g/ml (para TNF- α). Adicionou-se 100 μ l/poço e a placa foi mantida em temperatura ambiente, por aproximadamente 12 horas (*overnight*). Após esta etapa, a placa foi lavada quatro vezes. Para cada lavagem foram adicionados 300 μ l de solução de lavagem (0,05% Tween-20 em PBS) por poço. Adicionou-se 300 μ l de *block buffer* [1% Bovine

serum albumine (BSA) em PBS] por poço e a placa foi incubada por 60 minutos. Novas lavagens foram realizadas com solução de lavagem. Para a realização do ELISA, resumidamente, foram realizadas diluições seriadas do padrão em diluente (0,05% Tween-20, 0,1% BSA em PBS) e adicionado 100µl por poço, em duplicata, em concentração inicial de 1,5ng/ml (IL-6) e 2ng/ml (IL-8 e TNF- α) a zero, em seguida, a placa foi incubada por duas horas. Novas lavagens com solução de lavagem foram realizadas. Após esta etapa, o anticorpo de detecção para IL-6 (biotinylated antigen-affinity purified goat anti-hIL-6 + 2,5mg de D-mannitol), IL-8 (biotinylated antigen-affinity purified rabbit anti-hIL-8 + 2,5mg D-mannitol) e TNF- α (biotinylated antigen-affinity purified rabbit anti-hTNF- α + 0,5mg D-mannitol) foi diluído em diluente para concentração de 0,5µg/ml e adicionados 100µl/poço, e a placa foi incubada por duas horas. Novas lavagens com solução de lavagem foram realizadas. Após esta etapa, foi diluído o *Avidin-HRP Conjugate* 1:2000 em diluente e adicionado 100µl/poço e a placa foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente. Novas lavagens foram realizadas com solução de lavagem. Foi adicionado 100µl de *ABTS Liquid Substrate Solution*. A placa foi então incubada em temperatura ambiente, na ausência de luz, para o desenvolvimento da cor, e em seguida realizada a leitura empregando absorvância à 405nm, utilizando-se leitor de ELISA (DIATECH).

4.3 Dosagem de Lf e Hst-5 no FCG

Os níveis de Lf e histatinas (1-12) no FCG foram determinados por ELISA do tipo direto. Resumidamente, realizaram-se diluições seriadas de Lf (Lactoferrin from human Milk – SIGMA) e Hst-5 (N-20; sc-28110P, Santa Cruz), em concentração inicial de 5µg/ml. Adicionou-se 100µl de cada concentração de Lf e Hst-5 por poço, em duplicata, para realizar dos padrões. Foram adicionadas duas tiras de Periopaper de cada paciente em 300µl de PBS nos diferentes tempos do estudo para a dosagem de cada peptídeo antimicrobiano. Cada amostra foi agitada em vórtex por 1 minuto e, em seguida, a amostra diluída foi adicionada à placa de ELISA, em duplicata (100µl por poço), e mantida em temperatura ambiente, por aproximadamente 12 horas (*overnight*). Após esta etapa, foi realizado o bloqueio da placa com 200µl/poço de ovalbumina a 10%, (Sigma Albumin from Chicken Egg Whites Grade II), pelo período de duas horas, em temperatura ambiente. Após o bloqueio, foi adicionado 100µl/poço do anticorpo primário policlonal para Lf: anti-lactoferrina humana (Sheep anti human

lactoferrin: hrp ab-direct) e para Hst-5: anticorpo primário policlonal de cabra anti-histatinas humanas (Histatin - N20; sc 28110, Santa Cruz), diluído em ovalbumina 1%, na concentração de 1:300, e incubado durante duas horas, em temperatura ambiente. Após essa etapa, foram realizadas três lavagens da placa com PBS. Em seguida, adicionado 100µl por poço do anticorpo secundário para Lf (Rabbit Anti-Sheep IgG H&L (HRP) ab97130) e para histatinas (Donkey anti-goat IgG-HRP: sc-2020, Santa Cruz), diluído em ovalbumina 1%, na concentração 1:2.000, e incubado por 90 minutos, em temperatura ambiente. Após novas lavagens com PBS, foi realizada a revelação com *o-Phenylenediamine dihydrochloride* (OPD) seguindo as recomendações do fabricante. A placa foi então incubada em temperatura ambiente, na ausência de luz, por 45 minutos, e em seguida realizada a leitura empregando absorvância à 450nm, utilizando-se leitor de ELISA (DIATECH).

5. Análise estatística

A análise estatística foi realizada considerando-se testes bicaudais e alfa de 0,05. Análises descritivas incluíram estimadores pontuais como médias, desvios padrão, medianas e quartis (primeiro quartil, -Q1 e terceiro quartil, Q3) conforme necessário. Análises bivariadas de comparação entre os grupos em momentos isolados (sem dependência de dados) incluíram teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher para desfechos categóricos, e para desfechos contínuos testes paramétricos (teste-t) e testes não paramétricos (Mann Whitney). Para comparações de desfechos entre os três tempos para um mesmo grupo foram realizados testes levando em consideração a dependência dos dados ao longo do tempo. Quando desfechos possuíam distribuição normal, análise de variância de modelos mistos, considerando o indivíduo como fator aleatório e tempo como fator fixo, foi utilizado para comparação entre os três tempos. No caso de desfechos com distribuições não normais (não definidas) o teste de Friedman foi empregado. Comparações entre os dois grupos e ao longo do tempo para distribuições normais foram realizadas por meio de modelos mistos considerando o indivíduo como fator aleatório e as variáveis grupo e tempo como fatores fixos. No caso de distribuição não normal foi utilizado análise de variância de modelos mistos incluindo comando ANOVAF e estimador de covariância não estruturada para cada tratamento especificamente. Todas as análises foram realizadas no programa SAS 9.1.

5 RESULTADOS

5.1 Pacientes

Um total de 1.528 prontuários médicos foi identificado e revisado na UETDI-HC-FMRP-USP, e 80 pacientes não-infectados pelo HIV, encaminhados por UBSs de Ribeirão Preto, foram identificados na FORP-USP (**Figura 1**). Em relação aos pacientes infectados pelo HIV (grupo teste), 179 pacientes foram eleitos para entrevista e exame periodontal simplificado no intuito de diagnosticar presença de periodontite crônica. Dentre eles, 154 foram excluídos (sendo 59 tabagistas, 25 com histórico de uso de antibióticos nos últimos seis meses; 19 periodontalmente saudáveis; 05 diabéticos; 06 hipertensos; 10 desdentados totais; 09 usuários de drogas ilícitas; 11 com problemas motores que comprometiam os cuidados de higiene oral; 02 com número insuficiente de dentes; 01 menor de idade e 07 que não aceitaram participar da pesquisa por motivos pessoais) e 25 atenderam a todos os critérios de inclusão exigidos no estudo e foram encaminhados à clínica de pós-graduação em Periodontia da FORP-USP para serem incluídos na pesquisa. Dos 25 pacientes triados, 01 foi a óbito durante o andamento da pesquisa e 02 perderam o seguimento, totalizando 22 pacientes infectados pelo HIV (grupo teste).

Em relação aos pacientes do grupo controle, dos 80 pacientes identificados, 38 foram excluídos por não atenderem aos critérios de inclusão, 42 foram submetidos à avaliação periodontal de triagem. Dez foram excluídos por não desejarem participar da pesquisa e 32 foram incluídos no estudo. Doze pacientes foram excluídos durante o tratamento periodontal, por abandono de tratamento (n=7) ou por retorno ao hábito de fumar (n=5). Destes, 20 concluíram todas as etapas da pesquisa.

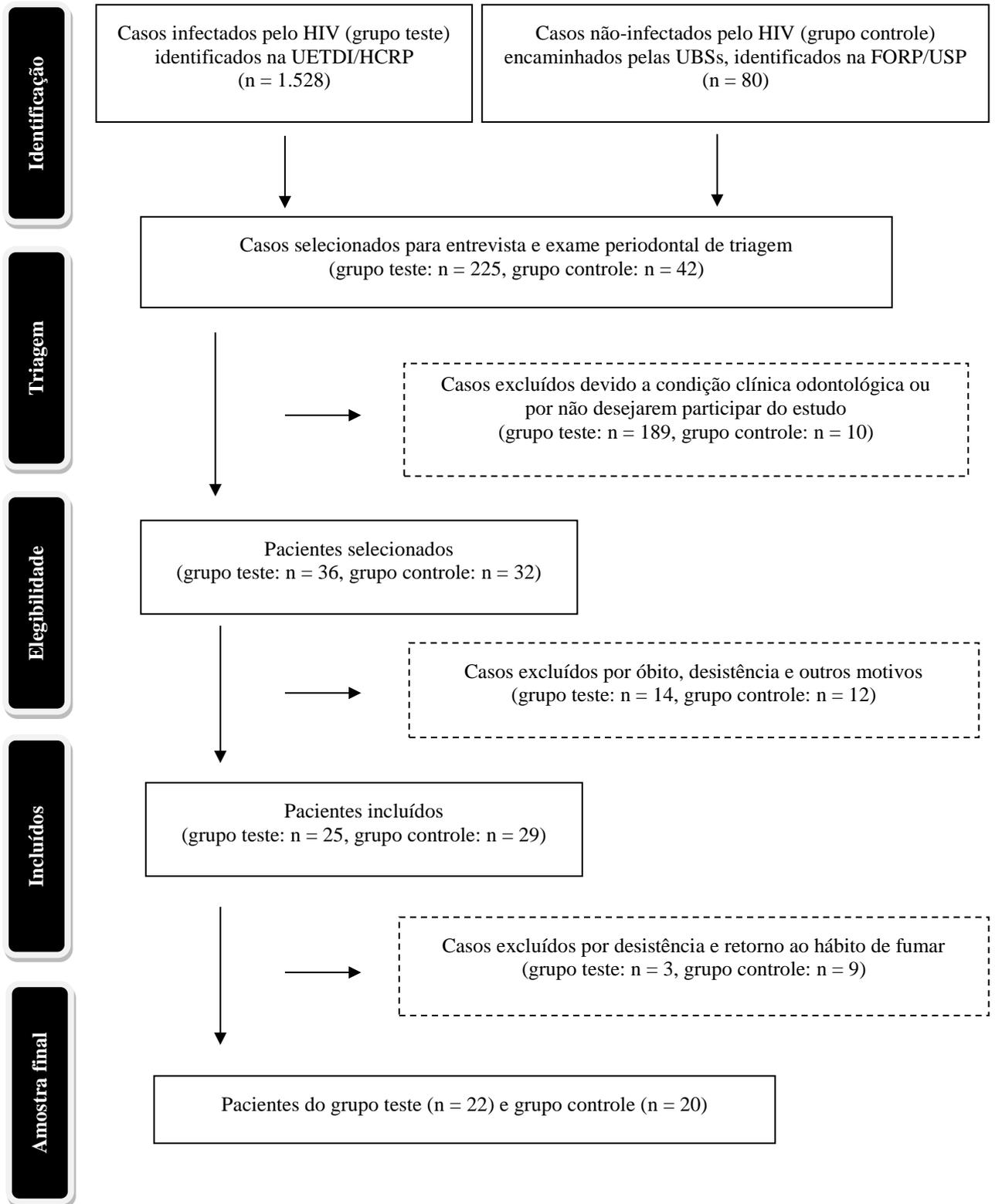


Figura 1. Fluxograma demonstrando o processo de triagem e seleção de pacientes incluídos no estudo.

5.1.2 Perfil clínico e sócio-demográfico

O perfil clínico e sócio-demográfico dos participantes da pesquisa está descrito na **Tabela 1**. Dos 22 pacientes do grupo teste, 14 (63,6%) foram do sexo masculino e 08 (35,4%) do sexo feminino, com idade média de 45 (27 – 54) anos, e cor branca (n=15; 68,2%). A maioria dos pacientes apresentava ensino fundamental incompleto (n=9; 40,9%) e eram solteiros (n=13; 59,1%) e 18 pacientes apresentaram algum tipo de infecção oportunista, com destaque para pneumonia (n=14; 63,6%), candidíase oral (n=13; 59,1%), e herpes zoster (n=9; 40,9%). Em relação aos pacientes do grupo controle, 4 (20%) foram do sexo masculino e 16 (80%) do sexo feminino, com idade média de 48 (22 – 75) anos, e também cor branca (n=19; 95%). A maioria dos pacientes apresentou ensino médio completo (n=8; 40%) e eram casados (n=16; 80%). Das infecções oportunistas, apenas candidíase oral foi detectada neste grupo (n=3; 15%).



Figura 2. Imagens clínicas de pacientes do grupo teste.

Tabela 1 - Perfil clínico e sócio-demográfico dos pacientes teste e controle. Dados apresentados como número absoluto (N) e porcentagem (%), exceto quando indicado.

Variáveis	Grupo teste (n=22)	Grupo controle (n=20)	Valor de <i>p</i>
Sexo			
Masculino	14 (63,6)	04 (20)	0,0043
Feminino	08 (36,4)	16 (80)	
Idade	44,8 (5,8*)	47,8 (12,8*)	0,3398
Cor/etnia			
Branco	15 (68,2)	19 (95)	0,0471
Não-branco	07 (31,2)	01 (5)	
Escolaridade			
Fundamental incompleto	09 (40,9)	07 (35)	
Fundamental completo	04 (18,2)	03 (15)	0,4081
Médio incompleto	05 (22,7)	02 (10)	
Médio completo	04 (18,2)	08 (40)	
Situação conjugal			
Casado	05 (22,7)	16 (80)	
Com parceiro	02 (9,1)	00 (0)	0,0001
Solteiro	13 (59,1)	03 (15)	
Divorciado/viúvo	02 (9,1)	01 (5)	
Uso de álcool			
Sim	01 (2,4)	00 (0)	0,9999
Não	21 (95,4)	20 (100)	
Infecções oportunistas			
Sim	18 (81,8)	3 (15)	0,0001
Não	4 (18,2)	17 (85)	

*Desvio padrão; Valor de *p* para teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher ou teste *t* (comparação de idade).

5.1.3 Características epidemiológicas e parâmetros imunológicos do grupo teste

As características epidemiológicas e os parâmetros imunológicos do grupo teste estão descritos na **Tabela 2**. O tempo médio de soropositividade para o HIV foi de $13,5 \pm 7,2$ anos e o tempo médio de tratamento na UETDI-HC-FMRP-USP foi de $10,7 \pm 8,5$ anos. O tipo de contaminação pelo HIV mais prevalente foi o sexual (n=14; 63,6%), seguido de transfusão de sangue (n=1; 4,5%), no entanto os demais não souberam informar exatamente a forma de contaminação (n=7; 31,9%). Em relação aos níveis de linfócitos TCD4+, houve tendência ao aumento da contagem média destas células do *tempo 0* ao *tempo 3* (90 dias após TPNC) (**Figura 3**). Em relação à carga viral plasmática, houve decréscimo do *tempo 0* ao *tempo 3* (**Figura 4**). O esquema de TARV mais utilizado entre os pacientes foi inibidor de transcriptase reversa análogo de nucleosídeo + inibidor de protease – onde a associação mais prevalente foi de tenofovir (TDF) + lamivudina (3TC) + atazanavir (ATV) (n=12; 54,5%).

Tabela 2 - Características epidemiológicas e parâmetros imunológicos do grupo teste.

Grupo teste (n=22)					
Variáveis	Média ± DP	Mediana	Q1-Q3	Mínimo-máximo	Valor de p
Tempo de soropositividade (anos)	13,5±7,2	15,0	7-17	2–29	NSA
Tempo de tratamento no HC (anos)	10,7±8,5	10,5	3-15	0,25–29	NSA
Teor de L TCD4+					
Tempo 0	104,7±57,3	105,0	66–140	11–206	0,0120
Tempo 2	165,7±110,4	178,0	67–228	15–359	
Tempo 3	195,6±155,2	122,0	93–273	29–622	
Carga viral					
Tempo 0	1.444.892,27±423174,5	40	40–106,9	40–1.941.107	0,2984
Tempo 2	19.547,4±66.181,4	40	40–249,0	40–282.443	
Tempo 3	28.380,8±103.229,3	40	40–239,0	40–461.382	

DP = desvio padrão; LTCD4 = linfócitos T CD4+; Valor de p para teste de Friedman para comparação dos valores ao longo do estudo.

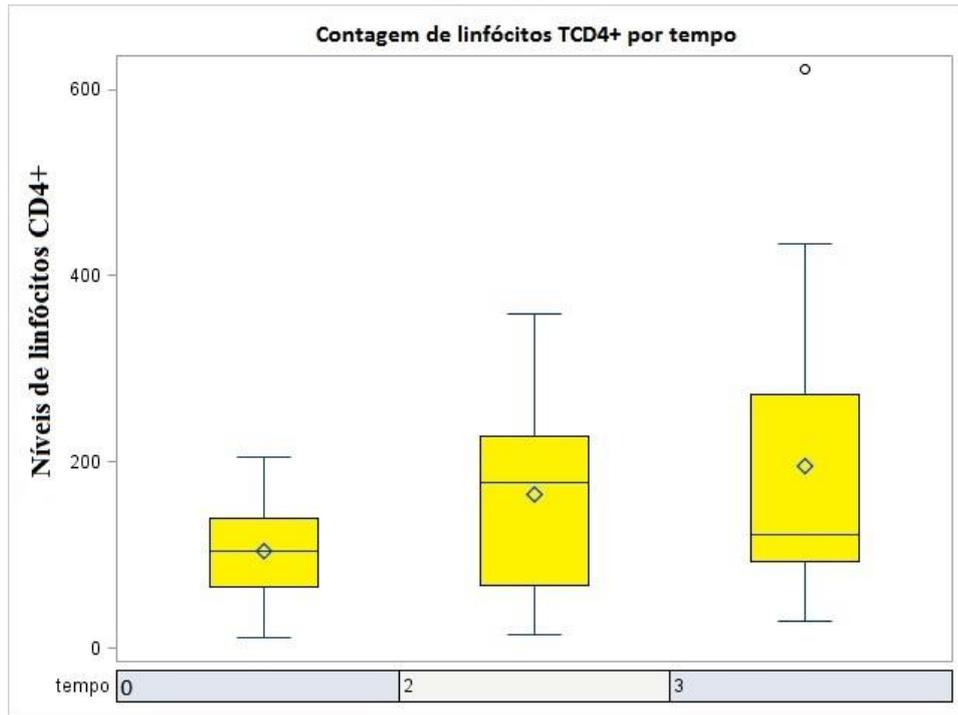


Figura 3. Níveis de linfócitos TCD4+ nos pacientes do grupo teste, nos diferentes tempos do estudo.

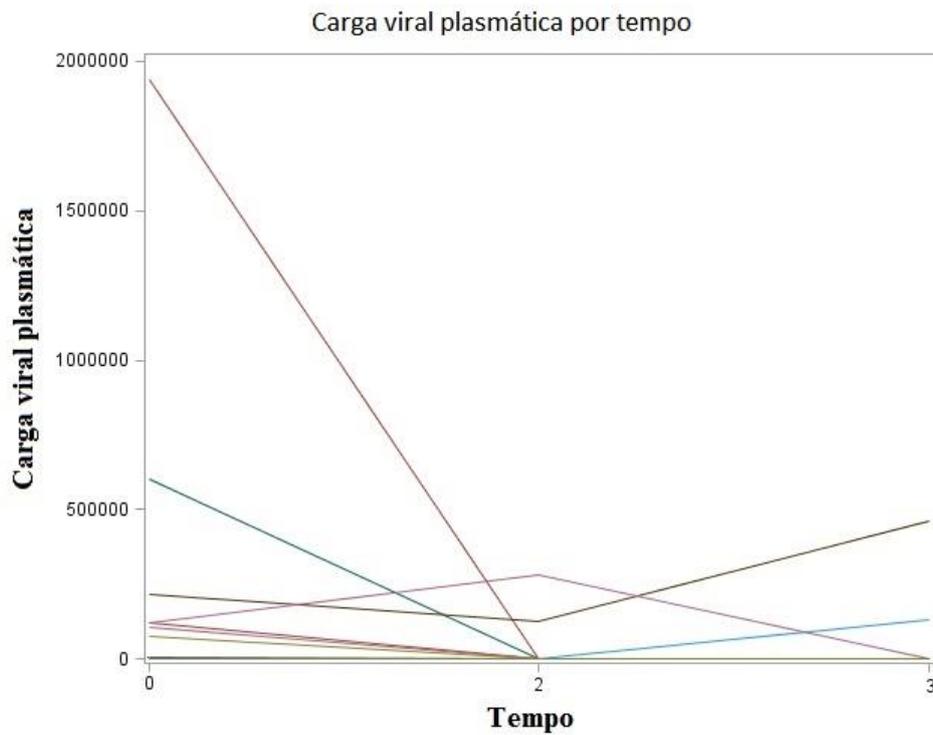


Figura 4. Carga viral plasmática nos pacientes do grupo teste, nos diferentes tempos do estudo.

5.2 Monitoramento clínico

O monitoramento dos parâmetros clínicos periodontais dos dois grupos está detalhado na **Tabela 3**. Houve redução significativa em IG, PS, bem como ganho de inserção clínica para ambos os grupos de estudo ao longo do tempo. Após ajuste (pós-teste de Tukey-Kramer) por número de dentes perdidos ($p=0,1556$), sexo ($p=0,4332$) e idade ($p=0,6244$), devido a estes serem potenciais fatores de confusão, não foi possível encontrar diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p=0,0715$) (**Tabela 8** em anexo; ANEXO D).

Em relação à porcentagem de IG, observou-se redução significativa nos dois grupos entre os *tempos 0 e 3*. Adicionalmente o grupo teste mostrou maior redução de IG entre os *tempos 0 e 2*, em comparação ao *tempo 3* (**Figura 5**).

Em relação à PS, o grupo teste apresentou maior redução, em comparação ao grupo controle, entre os *tempos 0 e 3*. Após ajuste, a PS diminuiu significativamente para os dois grupos com o tempo ($p<0,0001$) e esta diminuição foi mais significativa do *tempo 0 ao tempo 2*, principalmente para o grupo teste ($p<0,0001$), mas também para o grupo controle ($p=0,0038$). Entre os *tempos 2 e 3* não se pôde observar diminuição significativa de PS para os dois grupos, respectivamente ($p=0,2667$) e ($p=0,4680$) (**Figura 6**).

Quanto à NIC, ambos os grupos mostraram ganho de inserção clínica nos *tempos 2 e 3*, entretanto, o grupo teste mostrou maior ganho de inserção ao *tempo 3*, comparado ao grupo controle. Após ajuste, ambos os grupos mostraram ganho de inserção clínica ($p<0,0001$), principalmente para o grupo teste entre os *tempos 0 e 1* ($p=0,0004$), porém entre os *tempos 2 e 3*, observa-se estabilização ($p=0,9802$) (**Figura 7**).

Quanto ao número de dentes, os grupos apresentaram médias semelhantes no *tempo 0* (grupo teste=21,1; grupo controle=23,6), porém houve maior perda de dentes no grupo teste do *tempo 0 ao tempo 3*. O grupo controle apresentou estabilidade quanto ao número de dentes ao longo dos tempos (**Figura 8**).

Tabela 3 - Parâmetros clínicos periodontais

Variável	Tempo	Grupos experimentais (Média ± DP)		Comparação inter-grupos (Unpaired t test)		
		Grupo teste (n=22)	Grupo controle (n=20)	Diferença entre as médias	95% IC	Valor de p
IG (%)*	<i>Tempo 0</i>	35,4 (19,6 – 63,1)	24,3 (8 – 42,9)			0,1546**
	<i>Tempo 2</i>	10,3 (3,6 – 27,9)	9,2 (4,5 – 19)	NSA	NSA	0,5123
	<i>Tempo 3</i>	12,7 (3,9 – 22,5)	7,7 (3,9 – 13,4)			0,1583
PS (mm)	<i>Tempo 0</i>	2,81±0,5	2,86±0,5	-0,04	-0,23 – 0,14	0,6422
	<i>Tempo 2</i>	2,19±0,6	2,52±0,5	-0,33	-0,52 – -0,13	0,0009
	<i>Tempo 3</i>	1,96±0,5	2,32±0,5	-0,36	-0,55 – -0,17	0,0003
NIC (mm)	<i>Tempo 0</i>	3,11±0,7	3,32±0,9	-0,21	-0,71 – 0,30	0,4134
	<i>Tempo 2</i>	2,67±0,7	3,04±0,8	-0,37	-0,85 – 0,12	0,1352
	<i>Tempo 3</i>	2,59±1,0	2,88±0,9	-0,29	-0,89 – 0,31	0,3351
Número de dentes	<i>Tempo 0</i>	21,1±5,9	23,6±4,1	-2,51	-5,72 – 0,70	0,1226
	<i>Tempo 2</i>	20,0±5,8	23,3±4,1	-3,25	-6,42 - -0,08	0,0445
	<i>Tempo 3</i>	19,8±5,9	23,0±4,3	-3,23	-6,50 – 0,04	0,0525

DP = desvio padrão; 95% IC = 95% de intervalo de confiança; PS = profundidade de sondagem; NIC = nível de inserção clínica; IG = índice gengival; *Para o IG foi calculada a mediana e valores de Q1-Q3 (entre parênteses), devido a distribuição não-normal; **Valor de p para IG referente a teste não-paramétrico Mann Withney; NSA = não se aplica.

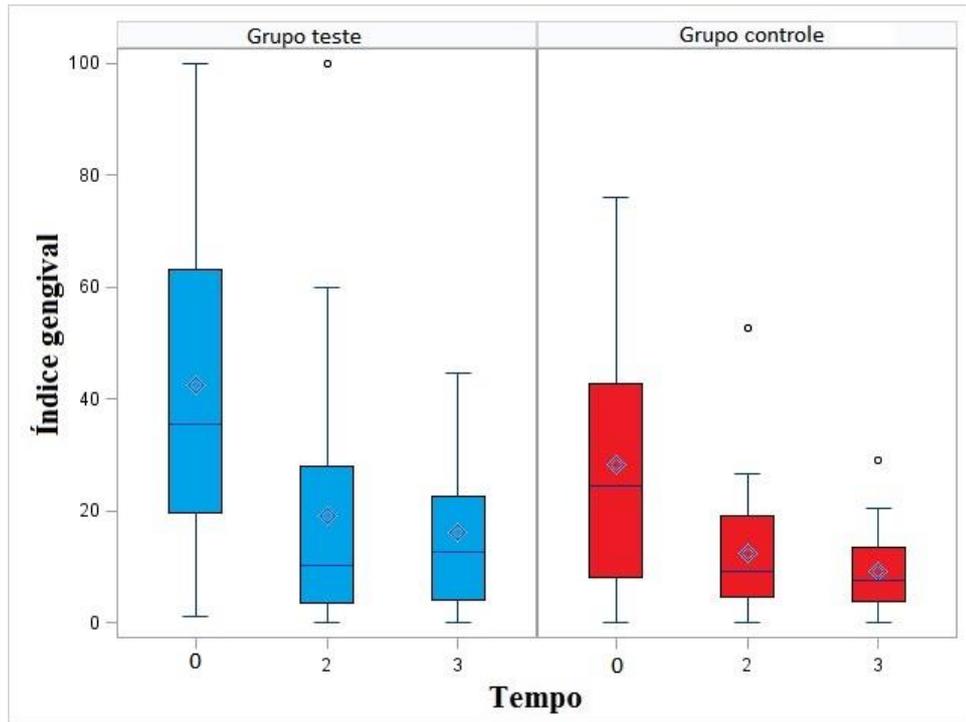


Figura 5. Índice gengival para grupos teste e controle, nos diferentes tempos do estudo.

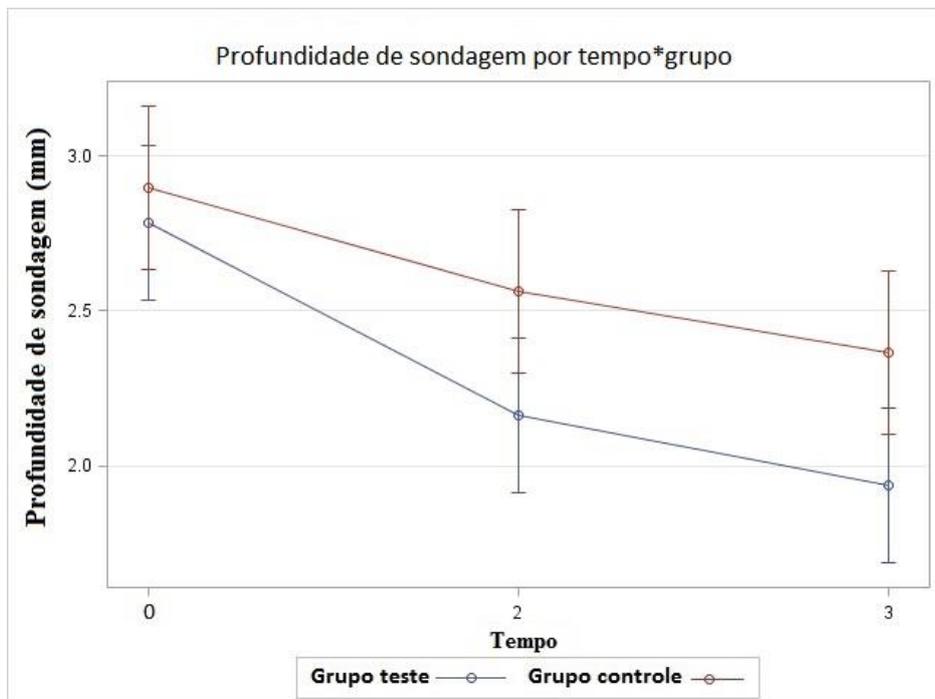


Figura 6. Profundidade de sondagem (mm) ao longo do estudo para grupos teste e controle (média e 95% IC calculados por modelo misto ajustado por número de dentes, sexo e idade).

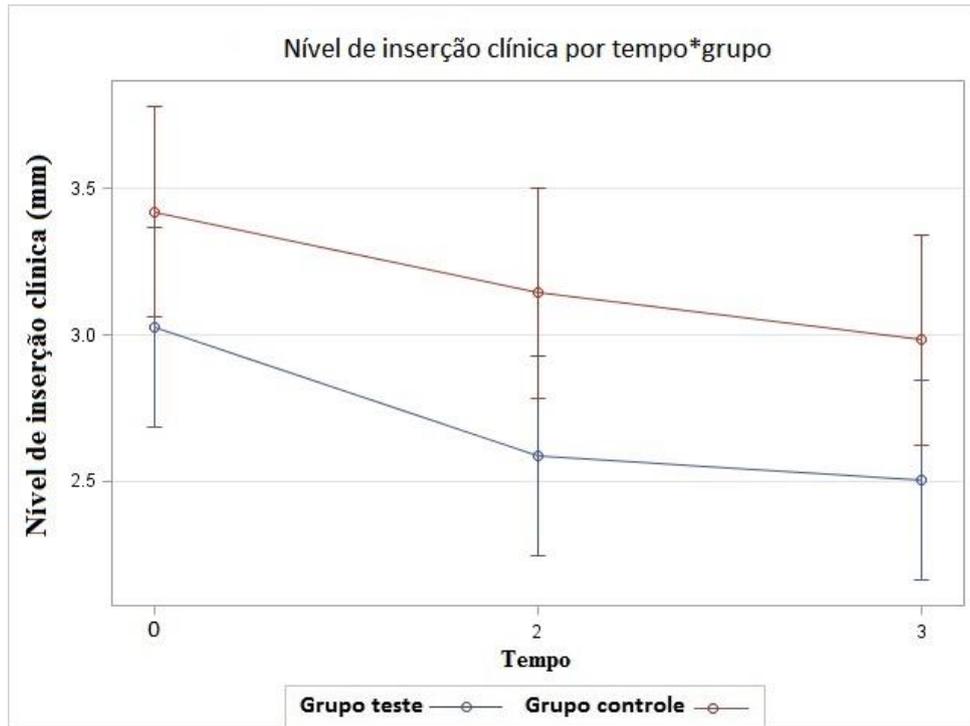


Figura 7. Nível de inserção clínica (mm) ao longo do estudo para grupos teste e controle (média e 95% IC calculados por modelo misto ajustado por número de dentes, sexo e idade).

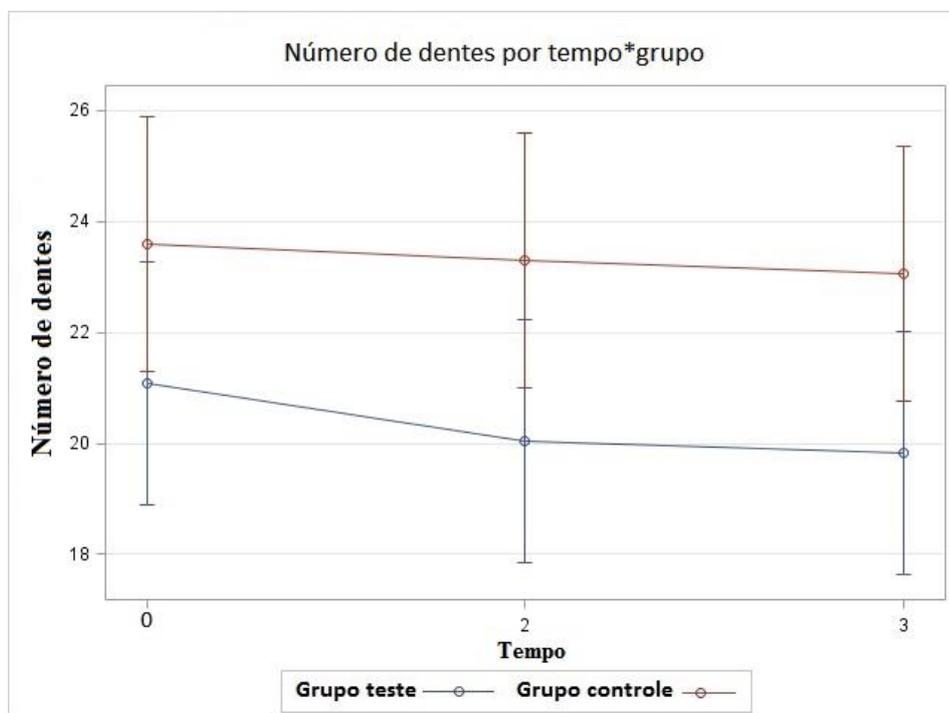


Figura 8. Número de dentes para grupos teste e controle, nos diferentes tempos do estudo (média e 95% IC – modelo misto).

5.3. Contagem oral de *Candida spp*

A contagem de UFCs de *Candida spp* nos dois grupos está detalhada na **Tabela 4**. O grupo teste apresentou maior diminuição no número de UFCs ao longo dos três tempos, e isto foi estatisticamente significativo ($p=0,0090$). O ANOVAF para ambos os grupos mostrou que houve diminuição geral com o tempo ($p<0,0001$) (**Figura 9**).

Tabela 4 - Contagem de UFCs de *Candida spp* para os grupos teste e controle, nos diferentes tempos do estudo.

Variável	Tempo	Grupo teste (n=11)	Grupo controle (n=10)	Valor de <i>p</i>
		Mediana (Q1 – Q3)	Mediana (Q1 – Q3)	
UFCs	<i>Tempo 0</i>	215,0 (104,0 – 910,0)	14,5 (5 – 120)	0,0375
	<i>Tempo 2</i>	87,0 (0 – 552,0)	25 (0 – 103)	0,3773
	<i>Tempo 3</i>	47,0 (0 – 424,0)	3,5 (0 – 190,0)	0,6156

UFCs = Unidades formadoras de colônias; Valor de *p* para teste de Mann Whitney.

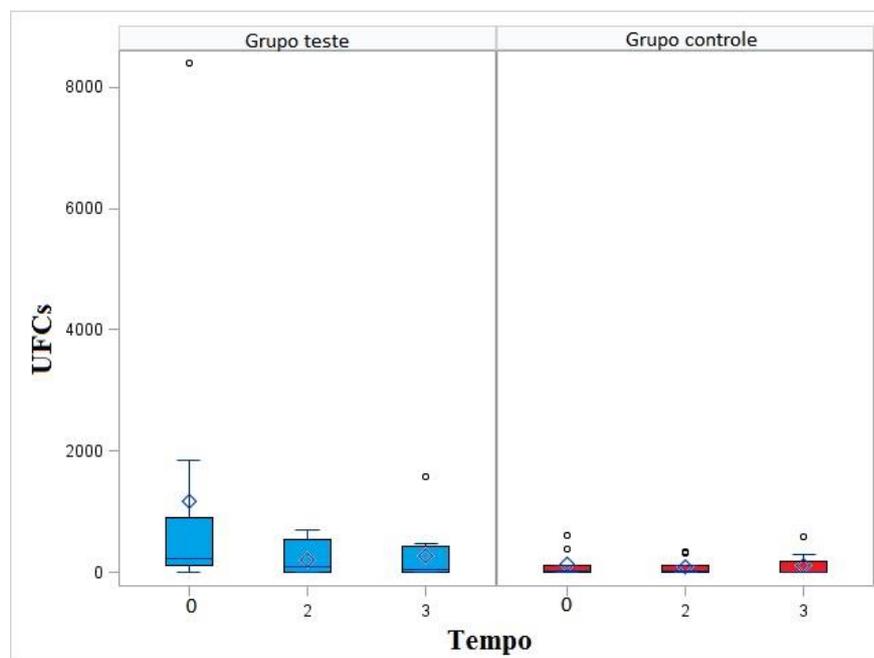


Figura 9. Contagem de *Candida spp* para grupos teste e controle, nos diferentes tempos do estudo.

5.4 Espécies de *Candida spp*

A frequência de pacientes que apresentaram crescimento das espécies de *Candida spp* nos dois grupos está detalhada na **Tabela 5**. As espécies foram caracterizadas como *C. albicans* e *C. não-albicans*. Em relação à presença de *C. albicans*, podemos observar que o grupo teste e controle foram homogêneos, e que ambos apresentaram tendência a diminuição comparando o *tempo 0* ao *tempo 3*. Em relação a *C. não-albicans*, no *tempo 0*, os grupos foram homogêneos, porém nos *tempos 2 e 3*, foram distintos entre si.

Tabela 5 - Frequência de pacientes que apresentaram UFCs de *Candida spp.* Dados apresentados como número absoluto (N) e porcentagem (%).

Variável	Grupo teste (n=22)				Grupo controle (n=20)			
	Tempo 0	Tempo 2	Tempo 3	Valor de <i>p</i>	Tempo 0	Tempo 2	Tempo 3	Valor de <i>p</i>
<i>C. albicans</i>								
Sim	9 (40,9)	8 (36,4)	8 (36,4)	0,7088	6 (30)	7 (35)	4 (20)	0,5630
Não	13 (59,1)	14 (63,6)	14 (63,6)		14 (70)	13 (65)	16 (80)	
<i>C. não-albicans</i>								
Sim	2 (9,1)	3 (13,6)	2 (9,1)	0,3125	2 (10)	0 (0)	0 (0)	0,3220
Não	20 (90,9)	19 (86,4)	20 (90,9)		18 (90)	20 (100)	20 (100)	

Valor de *p* para teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher.

5.5 Monitoramento imunológico

O monitoramento imunológico, representado pela dosagem de biomarcadores dos dois grupos está detalhado nas **Tabelas 6 e 7**. Para IL-6 salivar, houve tendência à diminuição nas concentrações no *tempo 0* ao *tempo 3* para ambos os grupos (**Figura 10**), no entanto, na análise multivariada, levando em consideração a dependência dos dados entre os indivíduos, e após ajuste por sexo e idade, os grupos foram diferentes ($p < 0,0001$), porém o fator tempo não foi estatisticamente significativo ($p = 0,6879$), assim como o sexo ($p = 0,9617$) e idade ($p = 0,3044$).

Em relação à IL-8 salivar, houve tendência ao aumento nas concentrações no *tempo 0* ao *tempo 2*, e diminuição do *tempo 2* ao *tempo 3* para ambos os grupos (**Figura 11**), no entanto, na análise multivariada, os grupos também foram diferentes ao longo do estudo ($p < 0,0001$), porém o tempo foi *borderline* ($p = 0,0557$) e sexo ($p = 0,1864$) e idade ($p = 0,2178$) não foram estatisticamente significantes.

Para TNF- α salivar, houve tendência ao aumento nas concentrações no *tempo 0* ao *tempo 2*, e sutil diminuição no *tempo 2* ao *tempo 3* para o grupo teste. No grupo controle, não foi detectado TNF- α na saliva em nenhum dos tempos (**Figura 12**). Na análise multivariada, os grupos também foram diferentes ($p = 0,0015$), e não foi possível observar mudanças estatisticamente significantes entre os tempos ($p = 0,7013$). Os ajustes para sexo ($p = 0,4178$) e idade ($p = 0,9794$) não foram significantes para prever mudanças nas concentrações de TNF- α na saliva.

A quantificação de Lf no FCG mostrou tendência ao aumento do *tempo 0* ao *tempo 2*, e sutil diminuição do *tempo 2* ao *tempo 3* no grupo teste. Por outro lado, no grupo controle, houve tendência à diminuição nas concentrações do *tempo 0* ao *tempo 2*, e aumento do *tempo 2* ao *tempo 3* (**Figura 13**). Após a análise multivariada, os grupos foram diferentes entre si ao longo dos tempos ($p < 0,0001$), porém não foi possível detectar associação estatística nos níveis de Lf no FCG ($p = 0,8655$).

Em relação à Hst-5 no FCG, houve tendência ao aumento em todos os tempos no grupo teste. No grupo controle, houve tendência ao aumento do *tempo 0* ao *tempo 2* e diminuição do *tempo 2* ao *tempo 3* (**Figura 14**). Na análise multivariada, os grupos também foram diferentes entre si ao longo dos tempos ($p < 0,0001$), porém não foi possível detectar diferenças significantes nos níveis de Hst-5 no FCG ao longo do tempo ($p = 0,1766$), e nem interação entre grupo e tempo ($p = 0,783$).

Tabela 6 - Quantificação da IL-6, IL-8 e TNF- α na saliva dos pacientes do grupo teste e controle, nos diferentes tempos do estudo. Os dados são apresentados como mediana (Q1 – Q3).

Variável	Tempo	Grupo teste (n=20)	Grupo controle (n=17)	Valor de <i>p</i>
		Mediana (Q1 - Q3)	Mediana (Q1 - Q3)	
IL-6	<i>Tempo 0</i>	1584,0 (1102,4-2093,8)	803,0 (428,9-1055,5)	0,0004
	<i>Tempo 2</i>	1343,2 (1027,5-2482,0)	672,1 (559,8-962,0)	0,0003
	<i>Tempo 3</i>	1532,6 (976,1-2322,9)	644,0 (485,0- 915,2)	0,0010
IL-8*	<i>Tempo 0</i>	376,2 (308,2-502,2)	91,4 (0,38-243,5)	0,0002
	<i>Tempo 2</i>	439,9 (251,7-535,5)	97,8 (0-179,5)	0,0007
	<i>Tempo 3</i>	334,2 (124,3-429,8)	68,3 (0-162,8)	0,0036
TNF- α **	<i>Tempo 0</i>	0 (0-110,2)	0 (0-0)	0,0819
	<i>Tempo 2</i>	42,8 (0-659,2)	0 (0-0)	0,0049
	<i>Tempo 3</i>	32,2 (0-365,1)	0 (0-0)	0,0289

*IL-8 (n=19 no grupo teste); **TNF- α (n=18 no grupo teste); Valor de *p* para teste de Mann Whitney.

Tabela 7 - Quantificação da Lf e Hst-5 no FCG dos pacientes do grupo teste e controle, nos diferentes tempos do estudo.

Variável	Tempo	Grupo teste (n=22)	Grupo controle (n=20)	Valor de <i>p</i>
		Mediana (Q1 – Q3)	Mediana (Q1 – Q3)	
Lf	<i>Tempo 0</i>	884,4 (505,4 – 1073,0)	670,3 (486,0 – 848,5)	0,0365
	<i>Tempo 2</i>	1039,4 (694,0 – 1354,1)	543,0 (456,1- 770,7)	0,0008
	<i>Tempo 3</i>	888,0 (773,1 – 1156,4)	574,4 (501,0 – 754,2)	0,0065
Hst-5	<i>Tempo 0</i>	9783,5 (5895,2 – 14581,9)	2586,0 (1758,7 – 6308,9)	0,0007
	<i>Tempo 2</i>	13540,7 (6952,1 – 18405,8)	3951,1 (3082,4 – 5853,9)	<0,0001
	<i>Tempo 3</i>	11009,4 (6929,3 – 15318,0)	2255,1 (1014,1 – 6681,2)	0,0001

DP = desvio padrão; IC = intervalo de confiança; Lf = lactoferrina; Hst-5 = histatina-5; Valor de *p* para teste de Mann Whitney.

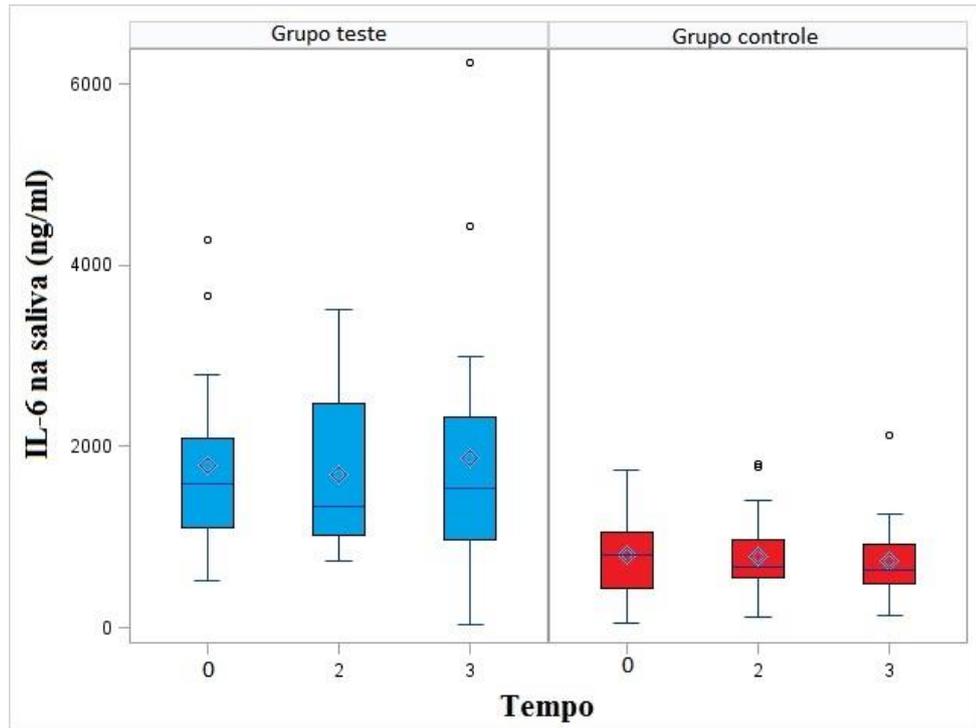


Figura 10. Concentrações de IL-6 na saliva (ng/ml) ao longo do estudo para grupos teste e controle.

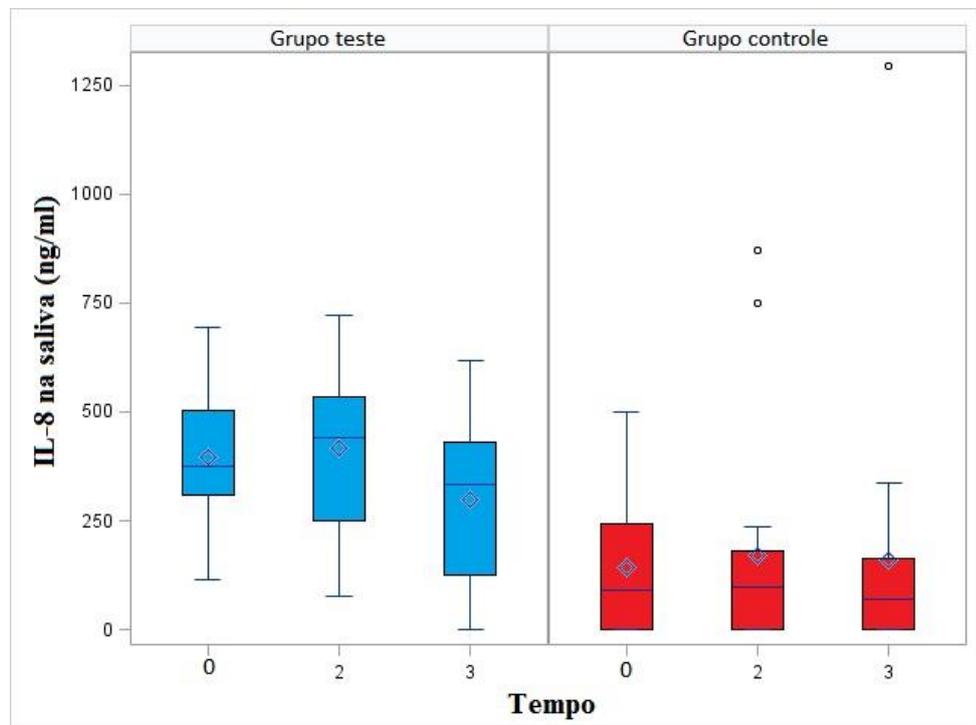


Figura 11. Concentrações de IL-8 na saliva (ng/ml) ao longo do estudo para grupos teste e controle.

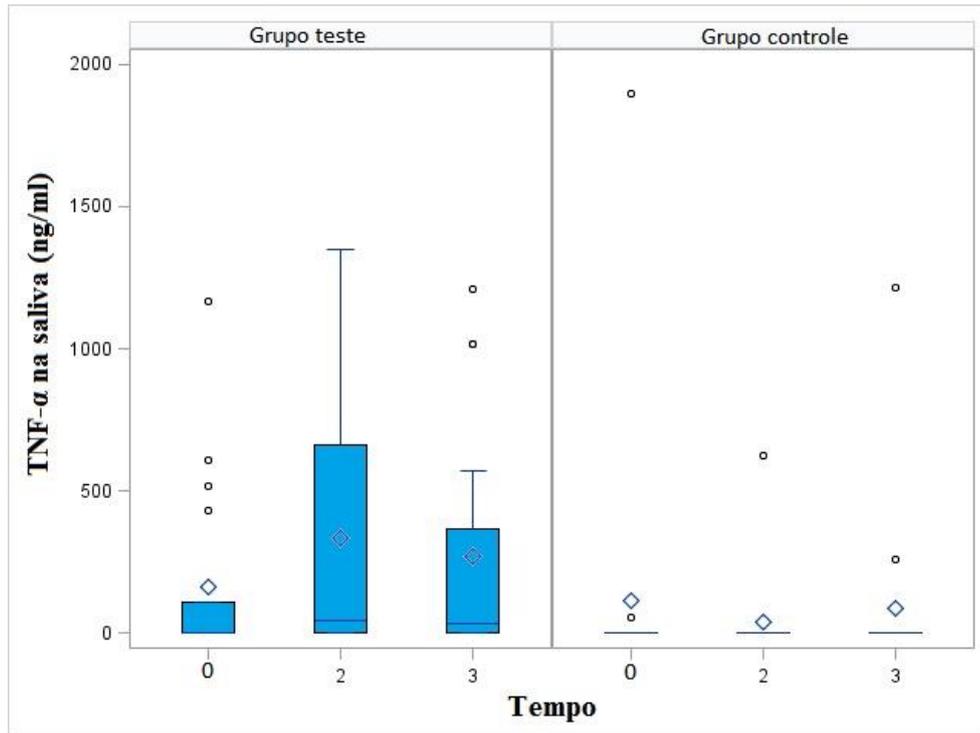


Figura 12. Concentrações de TNF- α na saliva (ng/ml) ao longo do estudo para grupos teste e controle.

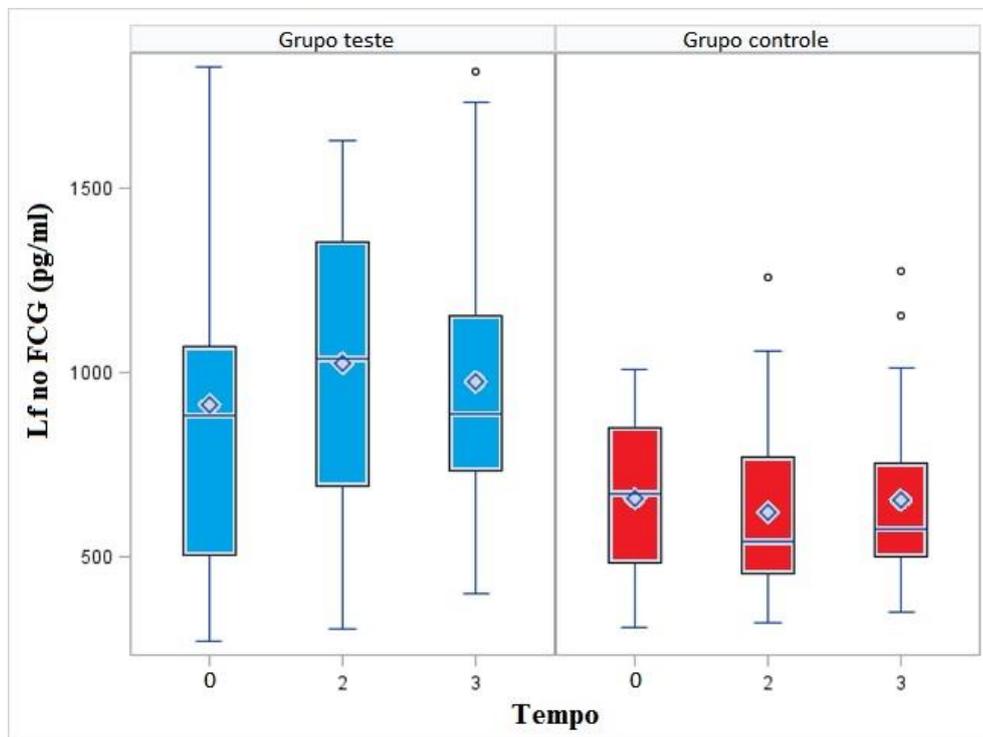


Figura 13. Concentrações de Lf no FCG (pg/ml) ao longo do estudo para grupos teste e controle.

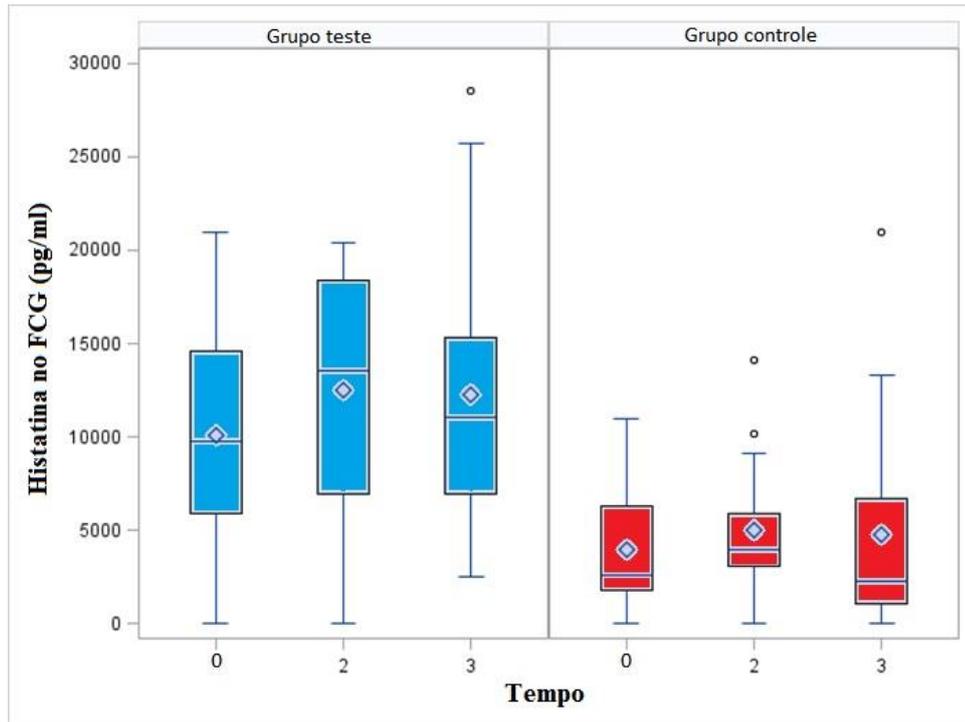


Figura 14. Concentrações de Hst-5 no FCG (pg/ml) ao longo do estudo para grupos teste e controle.

6 DISCUSSÃO

Este estudo caracterizou o perfil sócio-demográfico e avaliou as características clínicas, imunológicas e a colonização oral por *Candida spp* em 22 pacientes infectados pelo HIV com periodontite crônica sob TARV antes e após TPNC, e comparou com os achados de 20 pacientes com periodontite crônica não-infectados pelo HIV. O impacto da resposta inflamatória crônica que ocorre na doença periodontal como fator modificador de doenças/condições sistêmicas tem sido extensamente investigado (WILLIAMS & OFFENBACHER, 2000). Este estudo testou a hipótese da infecção pelo HIV ser um fator exacerbador da periodontite crônica, e avaliou se a TPNC possui a mesma efetividade entre infectados e não infectados pelo HIV com periodontite crônica. Foram eliminados fatores de confusão conhecidos como modificadores da doença periodontal, como tabagismo, gravidez, uso de álcool e drogas ilícitas, uso de antibióticos e anti-inflamatórios recentes, presença de outras doenças/condições sistêmicas e, para o grupo teste, foram selecionados indivíduos com estado de imunossupressão semelhante (linfócitos TCD4+ < 200 céls/mm³).

Dados relacionados à idade, escolaridade e uso de álcool não foram estatisticamente significantes entre os grupos, estando de acordo com os achados de Elizondo et al. (2017) que não verificaram diferenças em fatores sociais, como nível de escolaridade e consumo de álcool em coortes de pacientes infectados e não-infectados pelo HIV, com médias de idade semelhantes às do presente estudo. Dos 22 pacientes infectados pelo HIV, 14 (63,6%) eram do sexo masculino, acompanhando a tendência de crescimento da taxa de detecção de AIDS em homens nos últimos 10 anos (BRASIL, 2017). O tempo de soropositividade foi em média 13,5±7,2 anos, o que sugere alta expectativa de vida para estes pacientes no Brasil, principalmente devido à eficiência do programa de controle da infecção pelo HIV no Brasil, incluindo acesso fácil e gratuito à TARV (LEVI & VITÓRIA, 2002).

Em relação aos parâmetros clínicos da doença periodontal, as características clínicas da periodontite crônica em infectados pelo HIV na era pós-TARV foram semelhantes às de indivíduos não-infectados pelo HIV, e isto está de acordo com os achados de Friedman et al. (1991), Scheutz et al. (1997), Alves et al. (2006) e Khammissa et al. (2012). A TPNC resultou na diminuição no IG e PS, bem como ganho de inserção clínica em ambos os grupos, porém o grupo teste apresentou mais perda de dentes ao longo da pesquisa. Um dos fatores que pode ter influenciado a progressão da periodontite crônica em indivíduos infectados pelo HIV foi o efeito protetor de TARV. Todos os indivíduos do grupo teste estavam em uso de TARV regular, que incluiu inibidores de transcriptase reversa análogos de nucleosídeos, como a zidovudina

(AZT). Este fármaco apresenta atividade bactericida em certas bactérias gram-negativas, como *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* e *Enterobacter aerogenes* e pode ter efeito no controle de periodontopatógenos envolvidos na destruição periodontal (ELWELL et al., 1987; RILEY; LONDON; BURMEISTER, 1992; ALVES et al., 2006). Além disso, os inibidores de protease, outra classe de fármacos constituintes da TARV, ajudam a reduzir a destruição imune-regulada do periodonto (PATTON et al., 2000), e têm efeito inibitório sobre as proteinases aspárticas de *C. albicans*, espécie de fungo frequente nas infecções orais em pacientes infectados pelo HIV (MUNRO & HUBE, 2002).

Os parâmetros imunológicos da infecção pelo HIV também foram registrados nos três tempos do estudo. Embora os dados apresentados não eliminem a possibilidade de que a TARV tenha sido responsável pelo aumento significativo da contagem de linfócitos TCD4+ e diminuição da carga viral plasmática, os nossos resultados sugerem que a TPNC, por meio da descontaminação da cavidade oral, e consequente diminuição da inflamação local, possa ter tido impacto benéfico no status da infecção pelo HIV. A média da contagem de linfócitos TCD4+ no *tempo 0* foi de $104,7 \pm 57,3$ e no *tempo 3* (90 dias após a TPNC) foi de $195,6 \pm 155,2$ e a média de carga viral plasmática no *tempo 0* foi de $1.444.892,2 \pm 423174,5$ e no *tempo 3* foi de $28.380,8 \pm 103.229,3$. Estes resultados estão de acordo com os achados de Noro-Filho et al. (2013) e Valentine et al. (2016), que sugerem que o tratamento periodontal causa impacto benéfico nos parâmetros imunológicos da infecção pelo HIV. A diminuição da carga viral pode ter sido resultado do impacto da TPNC na microbiota oral, já que a presença de periodontopatógenos pode causar o desequilíbrio na microbiota simbiótica saudável, dificultando a supressão virológica do HIV conforme demonstrado pelo estudo de Pereira et al. (2013), que associaram níveis detectáveis de carga viral do HIV à níveis elevados de patógenos periodontais, como *Tanerella forshytia*, *Prevotella nigrescens* e *Eikenella corrodens*.

Em relação à colonização oral por *Candida spp*, nossos resultados mostraram que os indivíduos do grupo teste apresentaram contagem de UFCs/mL (215,0) superior ao grupo controle (14,5) semelhante aos achados de Sangeorzan et al. (1994), Delgado et al. (2009) e Lourenço et al. (2017), que verificaram maior colonização de *Candida spp* em indivíduos infectados pelo HIV, especialmente em pacientes com contagem de linfócitos TCD4+ < 200 céls/mm³. Além disso, os nossos resultados estão de acordo com os achados de Lourenço et al. (2017), que reportaram níveis elevados de *Candida spp* em indivíduos infectados pelo HIV com doença periodontal.

As mudanças que ocorrem na cavidade oral, na presença de doença periodontal ativa, como bolsas periodontais e aumento no FCG, desencadeiam o crescimento de formas

filamentares de *Candida spp* (REYNAUD et al., 2001; JÄRVENSIVU et al., 2004). Estudos mostraram que *C. albicans* tem capacidade de penetração nos tecidos periodontais (LISTGARTEN; LAI; YOUNG, 1993; SARDI et al., 2010; MACHADO et al., 2011), além de ter sido sugerido seu papel na infra-estrutura do biofilme, devido à detecção de espécies nas camadas mais externas, atuando como barreira entre a imunidade do hospedeiro e as camadas mais internas do biofilme, visto que *C. albicans* é potencialmente tolerante à imunidade inata (JÄRVENSIVU et al., 2004). Machado et al., (2011) relataram que células de *C. albicans* isoladas de indivíduos com periodontite crônica apresentam maior potencial in vitro de adesão às células epiteliais orais, quando comparadas às células de *C. albicans* isoladas de pacientes sem doença periodontal, sugerindo maior patogenicidade destes isolados. Estas características, além da expressão de fatores de virulência tais como a inibição de leucócitos polimorfonucleares (PMNs) e lise de monócitos (BARRETT-BEE et al., 1985) apontam a participação de *C.a albicans* na etiopatogênese da doença periodontal (CANABARRO et al., 2013).

No presente estudo, a contagem de UFCs/ml de *Candida spp* diminuiu após TPNC em ambos os grupos, e esta diminuição foi estatisticamente significativa. A descontaminação do ambiente subgingival e a melhora na higiene bucal nestes pacientes parece ter tido impacto positivo no controle da colonização oral por *Candida spp*, já que houve diminuição da contagem de UFCs do grupo teste de 215/mL para 47/mL e do grupo controle de 14,0 para 3,5 aos 90 dias pós-TPNC. Importante ressaltar que não foram utilizadas terapias antifúngicas adjuvantes durante o estudo.

Ainda sobre a colonização por *Candida spp*, além da contagem de UFCs, o presente estudo também analisou as espécies presentes nas amostras de enxaguado bucal e classificou como *C. albicans* e *não-albicans*. De acordo com Samaranayake et al. (1986), o enxaguado bucal é uma das técnicas mais sensíveis e de baixo custo para quantificar e detectar espécies de *Candida spp*, conforme utilizado no presente estudo. Foram detectadas mais espécies de *C. albicans* (representadas pela coloração verde no meio de cultura) no *tempo 0* em ambos os grupos, e houve tendência a diminuição após a TPNC. Estes resultados reforçam os achados de Canabarro et al. (2013), que detectaram níveis elevados de *C. albicans* em bolsas periodontais de pacientes com periodontite crônica, em comparação com indivíduos sem doença periodontal e também são semelhantes aos achados de Odden et al. (1994), Järvensivu et al. (2004), Canabarro et al. (2013) e Lourenço et al. (2017) que sugerem a espécie *C. albicans* como fator agravante da doença periodontal. Além disso, Lourenço et al. (2017) sugerem que a doença periodontal é um possível fator facilitador para a colonização por *Candida spp*, piorando as

condições periodontais, e por sua vez predispondo o paciente ao desenvolvimento das manifestações clínicas da candidíase.

Em relação aos biomarcadores salivares, a produção de citocinas pró-inflamatórias é controlada pelo fator nuclear Kappa-B (NF- κ B), um fator de transcrição que regula a expressão de vários genes envolvidos na resposta imune inata e adaptativa (LOURUSSO & RUEGG, 2008). A desregulação do NF- κ B resulta no desequilíbrio da produção de citocinas pró-inflamatórias, como acontece em várias doenças/condições inflamatórias crônicas, doenças autoimunes e câncer (FEGHALI & WRIGHT, 1997; ALLAVENA et al., 2008). Muitos estudos têm buscado biomarcadores da doença periodontal entre as proteínas salivares associadas à imunidade inata, devido às alterações que estas proteínas sofrem na presença de inflamação. Algumas condições sistêmicas modificam as concentrações dessas proteínas alterando suas funções como biomarcadores (MELLANEN et al., 2006). As citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-8 e TNF- α demonstraram exercer várias funções imunológicas, incluindo a regulação da resposta inflamatória e desenvolvimento do câncer (BRAILO et al., 2012). O presente estudo analisou as concentrações de IL-6, IL-8 e TNF- α salivares nos dois grupos.

Em relação à IL-6 salivar, após TPNC, houve diminuição das concentrações salivares em ambos os grupos. A IL-6 é uma das primeiras citocinas pró-inflamatórias secretadas após o reconhecimento microbiano, e é uma das citocinas da resposta imune inata, envolvida no processo de destruição periodontal (VAN DYKE & VAN WINKELHOFF, 2013). A redução nos níveis de IL-6 salivar após TPNC verificadas no presente estudo sugere que o tratamento periodontal, associado ao eficiente controle de biofilme supragengival, teve impacto benéfico na inflamação local, por meio da redução na formação de osteoclastos e na reabsorção óssea mediada por IL-6 (GOUTOUDI; DIZA; ARVANITIDOU, 2004; JOHANNSEN et al., 2007). Vários estudos têm reportado níveis aumentados de IL-6 em tecidos gengivais de pacientes com doença periodontal, quando comparados a sítios saudáveis (KAMAGATA et al., 1989; GUENTSCH et al., 2011). Nossos achados são semelhantes aos encontrados por Valentine et al. (2016), que reportaram diminuição significativa nos níveis salivares de IL-6 após terapia periodontal em pacientes com periodontite crônica infectados pelo HIV.

Em relação a IL-8 salivar, nossos achados mostraram declínio em suas concentrações ao longo do tempo do estudo em ambos os grupos. A IL-8 é uma citocina com potencial quimioatrativo para neutrófilos e parece estimular seletivamente a atividade da metaloproteinase dessas células e destruir colágeno na área da lesão (GROEGER & MEYLE, 2015). Vários estudos têm reportado níveis aumentados de IL-8 no FCG e no tecido gengival de pacientes com periodontite e foi relatada associação entre níveis elevados de IL-8 e aumento

de atividade destrutiva no periodonto (TSAI; HO; CHEN, 1995; GIANNOPOULOU; KAMMA; MOMBELLI, 2003). Teles et al. (2009) observaram associações positivas entre os níveis salivares de IL-8, profundidade de bolsas periodontais e porcentagens médias de sangramento em pacientes com periodontite crônica. O presente estudo mostrou que a TPNC reduziu os níveis de IL-8 salivares como demonstrado pelos estudos de Thunell et al. (2010) e Konopla et al. (2012), que reportaram que a TPNC resultou na melhora nos parâmetros clínicos periodontais e consequente diminuição nos níveis de IL-8 no FCG em pacientes com periodontite. São escassos estudos que avaliam os níveis de IL-8 na saliva de pacientes infectados pelo HIV com periodontite crônica, o que limita nossa discussão, entretanto considerando uma citocina pró-inflamatória envolvida na resposta imune local e sistêmica a antígenos bacterianos, possivelmente sua depleção causa efeito benéfico no quadro inflamatório local e consequentemente, sistêmico.

Em relação ao TNF- α salivar, o padrão de detecção desta citocina foi baixo, o que compromete a interpretação dos nossos achados, embora, curiosamente, tenhamos observado maiores níveis no grupo infectado pelo HIV após TPNC. O principal estímulo para produção de TNF- α é a presença de lipopolissacarídeos, que compõem a membrana das bactérias gram-negativas e seu papel no curso da periodontite está relacionado principalmente à sua capacidade de induzir destruição de tecido conjuntivo e reabsorção óssea (GROEGER & MEYLE, 2015). Spear et al. (2005) detectaram mínimas concentrações de TNF- α na saliva de pacientes infectados pelo HIV (<1pg/ml). É bem conhecido que o TNF- α pode ter sua expressão inibida por outras citocinas como o TGF- β e IL-4, além disso, por se tratar de uma citocina pró-inflamatória, esta diminuição em sua expressão pode ser resultado da interação com citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-4, IL-10 e TGF- β (NITTAYANANTA et al., 2014).

Em relação aos biomarcadores no FCG, os peptídeos antimicrobianos presentes na cavidade bucal participam da defesa natural contra microorganismos, e grande parte das doenças orais apenas se desenvolvem quando conseguem superar esta barreira (LOURENÇO et al., 2013). O presente estudo avaliou os níveis de Lf e Hst-5 no FCG nos dois grupos, antes e após TPNC.

Em relação à Lf no FCG, detectamos níveis maiores de Lf no FCG de indivíduos infectados pelo HIV, comparado aos níveis encontrados no grupo controle, e isso ocorreu em todos os tempos do estudo. A TPNC foi capaz de diminuir os níveis de Lf principalmente entre os *tempos 2 e 3* do estudo em ambos os grupos. Esta redução nos níveis de Lf pode ser atribuída à redução do número de leucócitos PMNs no FCG, uma vez que a Lf está presente em abundância nos grânulos secundários de PMNs (JENTSCH; SIEVERT; GOCKE, 2004). A

inflamação periodontal é caracterizada pelo aumento de granulócitos no sulco gengival e o aumento no número de PMNs funciona como marcador útil do estado inflamatório local (YADAV et al., 2014). Vários estudos têm reportado níveis aumentados de Lf no FCG na presença de gengivite (OZDEMIR et al., 2009) e periodontite (WEI et al., 2004; YADAV et al., 2014). Nossos achados estão de acordo com os de Yadav et al. (2014) que reportaram diminuição nos níveis de Lf no FCG após TPNC em indivíduos com periodontite crônica e Jentsch et al. (2004) que reportaram resultados semelhantes após a terapia periodontal cirúrgica. A escassez de estudos que avaliaram os níveis de Lf no FCG de indivíduos infectados pelo HIV antes e após TPNC limita a discussão. Apesar de ter sido relatada potente atividade antiviral, *in vitro*, da Lf contra o HIV (BERKHOUT et al., 2002), o papel de Lf no FCG e na saliva de indivíduos infectados pelo HIV com periodontite crônica ainda não é claro. Ferreira et al. (2015) não encontraram diferenças nos níveis de Lf no FCG de indivíduos infectados e não infectados pelo HIV com periodontite crônica. Além disso, este estudo não avaliou o efeito da terapia periodontal nas concentrações de Lf.

Em relação à determinação da Hst-5 no FCG, verificamos aumento nos níveis de Hst-5 do *tempo 0* ao *tempo 2* e diminuição do *tempo 2* ao *3* para ambos os grupos. Comparando apenas os níveis ao início e fim da pesquisa, os níveis de Hst-5 aumentaram no grupo teste e diminuíram no grupo controle. Para o melhor conhecimento, este é o primeiro estudo a avaliar a presença de Hst-5 e quantificá-la no FCG de indivíduos infectados pelo HIV com periodontite crônica antes e após TPNC. Um estudo prévio (BHADBHADE; ACHARYA; THAKUR, 2013) quantificou os níveis de Hst-5 no FCG e na saliva na presença de gengivite, periodontite e saúde periodontal, e reportou a presença de Hst-5 no FCG nas três condições, mas sem diferenças significantes em relação à doença periodontal e sua progressão. A utilidade da Hst-5 como biomarcador no FCG e seu papel na atividade da doença periodontal ainda é questionável. O potencial biomarcador da Hst-5 está bem mais relacionado com sua atividade antifúngica salivar contra espécies de *Candida spp* em pacientes imunocomprometidos, onde a diminuição nos níveis salivares de Hst-5 na infecção pelo HIV, pode explicar parcialmente o porquê de mais de 70% dos indivíduos infectados pelo HIV desenvolverem candidíase oral ao longo da doença (NIKAWA et al., 2002).

Este estudo teve algumas limitações, como a diferença entre os grupos teste e controle em relação ao sexo, já que o grupo controle teve maior proporção de indivíduos do sexo feminino (80%). Isto aconteceu devido às perdas e exclusões de indivíduos do sexo masculino neste grupo, relacionadas à descontinuidade no tratamento, e retorno a hábitos como o tabagismo. Outra limitação foi o fato dos pacientes infectados não estarem sob o mesmo regime

de TARV, e algumas classes destes fármacos têm sido investigadas com efeito na microbiota oral. Apesar destas limitações, os nossos resultados sugerem que pacientes infectados pelo HIV apresentam padrão semelhante de doença periodontal aos pacientes não infectados, e que o tratamento periodontal é efetivo no controle da doença periodontal em ambos os grupos. Além disso, o tratamento periodontal pode influenciar o status da infecção pelo HIV, favorecendo o aumento da contagem de linfócitos TCD4+ e redução da carga viral. Finalmente, pacientes infectados pelo HIV com periodontite crônica apresentam maior expressão salivar de IL-6 e IL-8 e de Lf e Hst-5 no FCG.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que:

- ✓ A periodontite crônica em indivíduos infectados pelo HIV na era pós-TARV possui padrão semelhante a indivíduos não-infectados pelo HIV;
- ✓ A TPNC possui a mesma efetividade em indivíduos infectados e não-infectados pelo HIV com periodontite crônica, observada na melhora dos parâmetros clínicos periodontais (IG, PS, NIC e número de dentes);
- ✓ A TPNC teve impacto benéfico nos parâmetros imunológicos da infecção pelo HIV (aumento nos níveis de linfócitos T CD4+ e diminuição da carga viral);
- ✓ A colonização oral por *Candida spp* foi maior em indivíduos infectados pelo HIV e a TPNC é capaz de reduzir as UFCs/mL em ambos os grupos;
- ✓ A TPNC é capaz de reduzir as concentrações salivares de IL-8 em indivíduos infectados e não infectados pelo HIV com periodontite crônica;
- ✓ Indivíduos infectados pelo HIV com periodontite crônica apresentam níveis maiores de IL-6, IL-8, TNF- α na saliva, e Lf e Hst-5 no FCG;

REFERÊNCIAS

- 1 AINAMO, J. & BAY, I. Periodontal indexes for and in practice. **Tandlaegebladet**, v. 80, n. 5, p. 149-152, 1976.
- 2 ALLAVENA, P.; GARLANDA, C.; BORRELLO, M. G. et al. Pathways connecting inflammation and cancer. **Curr Opin Genet Dev**, v. 18, n. 1, p. 3-10, 2008.
- 3 ALPAGOT, T.; DUZGUNES, N.; WOLF, L. F., et al. Risk factors for periodontitis in HIV patients. **J Periodontal Res**, v. 39. P. 149-157, 2004.
- 4 ALVES, M.; MULLIGAN, R.; PASSARO, D. et al. Longitudinal evaluation of loss of attachment in HIV-infected women compared to HIV-uninfected women. **J Periodontol**, v. 77, n. 5, p. 773-779, 2006.
- 5 APPAY, V.; ALMEIDA, J. R.; SAUCE, D., et al. Accelerated immune senescence and HIV-1 infection. **Exp Gerontol**, v. 42, n. 5, p. 432-437, 2007.
- 6 ARMITAGE, G. C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. **Ann Periodontol**, v. 4, n. 1, p. 1-6, 1999.
- 7 AUTRAN, B.; CARCELAIN, G.; LI, T. S., et al. Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. **Science**, v. 277, n. 5322, p. 112-116, 1997.
- 8 BAQUI, A. A.; MEILLER, T. F.; JABRA-RIZK, M. A., et al. Enhanced interleukin 1 beta, interleukin 6, and tumor necrosis factor alpha in gingival crevicular fluid from periodontal pockets of patients infected with human immunodeficiency virus 1. **Oral Microbiol Immunol**, v. 15, n. 2, p. 67-73, 2000.
- 9 BARR, C.; LOPEZ, M. R.; RUA-DOBLES, A. Periodontal changes by HIV serostatus in a cohort of homosexual and bisexual men. **J Clin Periodont**, v. 19, n. 10, p. 794-801, 1992.
- 10 BARRETT-BEE, K.; HAYES, Y.; WILSON, R. G. et al. A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. **J Gen Microbiol**, v. 131, n. 5, p. 1217-21, 1985.

- 11 BERBERI, A. & NOUJEIM, Z. Epidemiology and relationships between CD4+ counts and oral lesions among 50 patients infected with human immunodeficiency virus. **J Int Oral Health**, v. 7, n. 1, p. 18-21, 2015.
- 12 BERKHOUT, B.; VAN-WAMEL, J. L.; BELJAARS, L. et al. Characterization of the anti-HIV effects of native lactoferrin and other milk proteins and protein-derived peptides. **Antiviral Res**, v. 55, n. 2, p. 341-55, 2002.
- 13 BIRKEDAL-HANSEN, H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. **J Periodontal Res**, v. 28, n. 6, p. 500-10, 1993.
- 14 BHADBHADE, S. J.; ACHARYA, A. B.; THAKUR S. L. Salivary and gingival crevicular fluid histatin in periodontal health and disease. **J Clin Exp Dent**, v. 5, n. 4, p. 174-178, 2013.
- 15 BOYCE, B. F.; LI, P.; YAO, Z., et al. Tnf-alpha and pathologic bone resorption. **Keio J Med**, v. 54, p. 127-131, 2005.
- 16 BRAILO, V.; VUCICEVIC-BROSAS, V.; LUKAC, J. et al. Salivary and serum interleukin-1 beta, interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in patients with leukoplakia and oral cancer. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 17, n. 1, p. 10-5, 2012.
- 17 BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico HIV/AIDS**, 2017. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/es/node/59427>.. Acessado em: fevereiro 17, 2018.
- 18 BRENCHLEY, J. M.; DOUEK, D. C. HIV infection and the gastrointestinal immune system. **Mucosal Immunol**, v. 1, n. 1, p. 23-30, 2008.
- 19 BRUNETTI, G.; COLUCCI, S.; PIGNATARO, P., et al. T cells support osteoclastogenesis in an in vitro model derived from human periodontitis patients. **J Periodontol**, v. 76, n. 10, p. 1675-1680, 2005.
- 20 CANABARRO, A.; VALLE, C.; FARIAS, M. R. et al. Association of subgingival colonization of *Candida albicans* and other yeasts with severity of chronic periodontitis. **J Periodontal Res**, v. 48, n. 4, p. 428-432, 2013.

- 21 CHEN, W. C.; LAI, Y. H.; CHEN, H. Y., et al. Interleukin-17-producing cell infiltration in the breast cancer tumour microenvironment is a poor prognostic factor. **Histopathology**, v. 63, n. 2, p. 225-233, 2013.
- 22 CHENG, W. C.; HUGHES, F. J.; TAAMS, L. S. The presence, function and regulation of IL-17 and Th17 cells in periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 41, n. 6, p. 541-9, 2014.
- 23 DEEKS, S. G. HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging. **Annu Rev Med**, v. 62, p. 141-55, 2011.
- 24 DELGADO, A. C.; DE-JESUS-PEDRO, R.; AOKI, F. H., et al. Clinical and microbiological assessment of patients with a long-term diagnosis of human immunodeficiency virus infection and Candida oral colonization. **Clin Microbiol Infect**, v. 15, n. 4, p. 364-71, 2009.
- 25 DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (DHHS). Guideline for the use of antiretroviral agents in HIV-1 infected adults and adolescents. Disponível em: <https://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/adultandadolescentgl.pdf>. Acessado em 24 de novembro de 2017.
- 26 DRINKARD, C. R.; DECHER, L.; LITTLE, J. W., et al. Periodontal status of individuals in early stages of human immunodeficiency virus infection. **Community Dental Oral Epidemiol**, v. 19, n. 5, p. 281-285, 1991.
- 27 EC-CLEARINGHOUSE ON ORAL PROBLEMS RELATED TO HIV INFECTION AND WHO COLLABORATING CENTRE ON ORAL MANIFESTATIONS OF THE IMMUNODEFICIENCY VIRUS. Classification and diagnostic criteria for oral lesions in HIV infection. **J Oral Pathol Med**, v. 22, n.7, p. 289-291, 1993.
- 28 EGGIMANN, P.; GARBINO, J.; PITTET, D. Epidemiology of Candida species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **Lancet Infect Dis**, v. 3, n. 11, p. 658–720, 2003.
- 29 ELIZONDO, J. E.; ROCHA-PIZAÑA, M. D.; TREVIÑO, A. C. et al. Potential gingival crevicular fluid and serum biomarkers by stage of HIV infection. **Cytokine**, v. 91, p. 96-103, 2017.
- 30 ELWELL, L. P.; FERONE, R.; FREEMAN, G. A. et al. Antibacterial activity and mechanism of action of 3'-azido-3'-deoxythymidine (BW A509U). **Antimicrob Agents Chemother**, v. 31, n. 2, p. 274-280, 1987.

- 31 FALASCA, K.; VECCHIET, F.; UCCIFERRI, C., et al. Periodontitis and cytokine patterns in HIV positive patients. **Eur J Med Res**, v. 3, n. 4, p. 163-168, 2008.
- 32 FEGHALI, C. A. & WRIGHT, T. M. Cytokines in acute and chronic inflammation. **Front Biosci**, v.2 p. 12-26, 1997.
- 33 FERREIRA, S. M. S.; GONÇALVES, L. S.; TORRES, S. R., et al. Lactoferrin levels in gingival crevicular fluid and saliva of HIV-infected patients with chronic periodontitis. **J Investig Clin Dent**, v. 6, p.16-24, 2015.
- 34 FRIEDMAN, R. B.; GUNSOLLEY, J. GENTRY, A. et al. Periodontal status of HIV-seropositive and AIDS patients. **J Periodontol**, v. 62, p. 623-627, 1991.
- 35 GAITÁN-CEPEDA, L. A.; CEBALLOS-SALOBREÑA, A.; LÓPEZ-ORTEGA, K. et al. Oral lesions and immune reconstitution syndrome in HIV+/AIDS patients receiving highly active antiretroviral therapy. Epidemiological evidence. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 13, n. 2, p. 85-93, 2008.
- 36 GAMA, T.; PIRES, F. R.; ARMADA, L., et al. Cellular profile and expression of immunologic markers in chronic apical periodontitis from HIV-infected patients undergoing highly active antiretroviral therapy. **J Endod**, v. 42, n. 6, p. 921-7, 2016.
- 37 GENCO, R. J. Host responses in periodontal diseases: current concepts. **J Periodontol**, v. 63, n. 4 Suppl, p. 338-355, 1992.
- 38 GIANNOPOULOU, C.; KAMMA, J. J.; MOMBELLI, A. Effect of inflammation, smoking and stress on gingival crevicular fluid cytokine level. **J Clin Periodontol**, v. 30, n. 2, p. 145-153, 2003.
- 39 GONÇALVES, L. S.; FERREIRA, S. M.; SILVA JR, A., et al. Association of T CD4 lymphocyte levels and chronic periodontitis in HIV-infected brazilian patients undergoing highly active anti-retroviral therapy: clinical results. **J Periodontol**, v. 76, n. 6, p. 915-922, 2005.
- 40 GONZALES, J. R. T and B cell subsets in periodontitis. **Periodontol 2000**, v. 69, n.1, p. 181-200, 2015.
- 41 GOUTOUDI, P; DIZA, E.; ARVANITIDOU, M. Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-1beta and interleukin-10 levels in chronic periodontitis. **J Dent**, v. 32, n. 7, p. 511-520, 2004.

- 42 GROEGER, S. E. & MEYLE, J. Epithelial barrier and oral bacterial infection. **Periodontol** 2000, v. 69, n. 1, p. 46-67, 2015.
- 43 GROOT, F.; GEIJTENBEEK, T. B. H.; SANDERS, R. W. et al. Lactoferrin prevents dendritic cell-mediated human deficiency virus type 1 transmission by blocking the DC-SIGN-gp120 interaction. **J Virol**, v. 79, p. 3009-3015, 2005.
- 44 GUENTSCH, A.; KRAMESBERGER, M.; SROKA, A. et al. Comparison of gingival crevicular fluid sampling methods in patients with severe chronic periodontitis. **J Periodontol**, v. 82, n. 7, p.1051-60, 2011.
- 45 HAMMOND, M. E.; LAPOINTE, G. R.; FEUCHT, P. H., et al. IL-8 induces neutrophil chemotaxis predominantly via type I IL-8 receptors. **J Immunol**, v. 155, p. 1428-1433, 1995.
- 46 HELMERHORST, E. J.; VAN'T HOLF, W.; VEERMAN, E. C. I., et al. Synthetic histatin analogs with broad-spectrum antimicrobial activity. **Biochem J**, v. 326, n.1, p. 39-45, 1997.
- 47 HERON, S. A.; ELAHI, S. Hiv infection and compromised mucosal immunity: Oral manifestations and systemic inflammation. **Front Immunol**, v. 241, n 8, p. 1-16, 2017.
- 48 JÄRVENSIVU, A.; HIETANEN, J.; RAUTEMAA, R. et al. Candida yeasts in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms in vivo. **Oral Dis**, v. 10, n. 2, p. 106-112, 2004.
- 49 JENTSCH, H.; SIEVERT, Y.; GÖCKE, R. Lactoferrin and other markers from gingival crevicular fluid and saliva before and after periodontal treatment. **J Clin Periodontol**, v. 31, n. 7, p. 511-4, 2004.
- 50 JHONSON, L. F. & LEWIS, D. A. The effect of genital tract infections on HIV-1 shedding in the genital tract: a systematic review and meta-analysis. **Sex Transm Dis**, v. 35, n. 11, p. 946-959, 2008.
- 51 JHONSON D. Therapeutic management of HIV. **Oral Dis**, v. 8 Suppl. 2, p. 17-20, 2002.
- 52 JOHANNSEN, A.; RYDMARK, I.; SÖDER, B. et al. Gingival inflammation, increased periodontal pocket depth and elevated interleukin-6 in gingival crevicular fluid of

- depressed women on long-term sick leave. **J Periodontal Res**, v. 42, n. 6, p. 546-52, 2007.
- 53 KAMAGATA, Y.; MIYASAKA, N.; INOUE, E. et al. Cytokine production in inflamed human gingival tissues – interleukin6. **Nihon Shishubyo Gakkai Kaishi**, v. 31, n. 4, p. 1081-4, 1989.
- 54 KHAMMISSA, R.; FELLER, L.; ALTINI, M. et al. A comparasion of chronic periodontitis in HIV-seropositive subjects and the general population in the Ga-Rankuwa area, South Africa. **AIDS Res Treat**, v. 2012, p. 620962, 2012.
- 55 KHAN, S. A.; FIDEL-JR, P. L.; THUNAYYAN, A. A. et al. Impaired histatin-5 levels and salivary antimicrobial activity against *C. albicans* in HIV infected individuals. **J AIDS Clin Res**, v. 5, n. 4, p. 193, 2013.
- 56 KINANE, D. F.; LAPPIN, D. F.; KOULOURI, O., et al. Humoral immune responses in periodontal disease may have mucosal and systemic immune features. **Clin Exp Immunol**, v. 115, p. 534-541, 1999.
- 57 LAMONT, R. J. & HAJISHENGALLIS, G. Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease. **Trends in molecular medicine**, v. 21, n. 3, p. 172-183, 2015.
- 58 LEIGH, J. E.; STEELE, C.; WORMLEY JR, F. L., et al. Th1/Th2 cytokine expression in saliva of HIV-positive and HIV-negative individuals: a pilot study in HIV-positive individuals with oropharyngeal candidiasis. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol**. v. 19, n. 4, p. 373-80, 1998.
- 59 LEITE, R. M. S.; LEITE, A. A. C.; FRIEDMAN, H., et al. Glossite rombóide mediana associada a candidíase esofagiana. Uma possível relação etiológica com a *Candida albicans*. **An Bras Dermatol**, v. 77, n. 5, p. 579-583, 2002.
- 60 LEVI, G. C. & VITÓRIA, M. A. Fighting against AIDS: the Brazilian experience. **AIDS**, v. 18, n. 18, p. 2373-83, 2002.
- 61 LIMA, R. M. S.; LEITE, A. A. C.; FRIEDMAN, H. et al. Glossite rombóide mediana associada a candidíase esofágica. Uma possível relação etiológica com a *Candida albicans*. **An Bras Dermatol**, v. 77, n. 5, p. 579-83, 2002.

- 62 LINDHE, J; KARRING, T. L.; NIKLAUS, P. Clinical periodontology and implant dentistry. **Guanabara Koogan** – 4^a ed.; 2005, p.105.
- 63 LISTGARTEN, M. A.; LAI, C. H.; YOUNG, V. Microbial composition and pattern of antibiotic resistance in subgingival microbial samples from patients with refractory periodontitis. **J Periodontol**, v. 64, n. 3, p. 155-61, 1993.
- 64 LÖNNERDAL, B. & IYER, S. Lactoferrin: molecular structure and biological function. **Annu Rev Nutr**, v. 15, p. 93-110, 1995.
- 65 LOURENÇO, A. G. & FIGUEIREDO, L. T. M. Oral lesions in HIV infected individuals from Ribeirão Preto, Brazil. **Med Oral, Patol Oral y Cir Bucal**, v. 13, n. 5, p. 281-6, 2008.
- 66 LOURENÇO, A. G.; NAKAO, C.; MACHADO, A. A., et al. Lactoferrin, a marker for periodontal disease. **Curr HIV Res**, v. 11, n. 3, p. 220-5, 2013.
- 67 LOURENÇO, A. G.; RIBEIRO, A. E. R. A.; NAKAO, C. et al. Oral Candida spp carriage and periodontal disease in HIV-infected patients in Ribeirão Preto, Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 59, p. 59, 2017.
- 68 LOURUSSO, G. & RUEGG, C. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. **Histochem Cell Biol**, v. 130, n. 6, p. 1091-1103, 2008.
- 69 MACHADO, A. G.; KOMIYAMA, E. Y.; SANTOS, S. S. et al. In vitro adherence of Candida albicans isolated from patients with chronic periodontitis. **J Appl Oral Sci**, v. 19, n. 4, p. 384-7, 2011.
- 70 MACPHERSON, A. J. & HARRIS, N. L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 6, p. 478-485, 2004.
- 71 MATAFSI, M.; SKOURA, L.; SAKELLARI, D. HIV infection and periodontal diseases: an overview of the post-HAART era. **Oral Dis**, v. 17, n. 1, p. 13-25, 2011.
- 72 MATHUR, A.; MICHALOWICZ, B.; CASTILLO, M., et al. Interleukin-1 alpha, interleukin-8 and interferon-alpha levels in gingival crevicular fluid. **J Periodontal Res**, v. 31, n. 7, p. 489-95, 1996.
- 73 MELLANEN, L.; LÄHDEVIRTA, J.; TERVAHARTIALA, T. et al. Matrix metalloproteinase-7, -8, -9, -25, and -26 and CD43, -45, and -68 cell-markers in HIV-

- infected patients' saliva and gingival tissue. **J Oral Pathol Med**, v. 35, n. 9, p. 539-9, 2006.
- 74 McCAULEY, L. K. & NOHUTCU, R. M. Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling: principles and implications for diagnosis and therapy. **J Periodontol**, v. 73, n. 11, p. 1377-91, 2002.
- 75 MCKAIG, R. G.; THOMAS, J. C.; PATTON, L. L., et al. Prevalence of HIV-associated periodontitis and chronic periodontitis in a southeastern US study group. **J Public Health Dent**, v. 58, n. 4, p. 294-300, 1998.
- 76 MILLER, V.; MOCROFT, A.; REISS, P., et al. Relations among CD4 lymphocyte count nadir, antiretroviral therapy, and HIV-1 disease progression: results from the EuroSIDA Study. **Ann Intern Med**, v. 130, n. 7, p. 570-577, 1999.
- 77 MUNRO, C. A. & HUBE, B. Anti-fungal therapy at the HAART of viral therapy. **Trends Microbiol**, v. 10, n. 4, p. 173-7, 2002.
- 78 MURAMAKI, Y.; XU, T.; HELMERHORST, E. J. et al. Inhibitory effect of synthetic histatin 5 on leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Oral Microbiol Immunol**, v. 17, p. 143-149, 2002.
- 79 NIKAWA H.; JIN C.; MAKIHIRA S.; et al. Susceptibility of *Candida albicans* isolates from the oral cavities of HIV-positive patients to histatin-5. **J Prosthet Dent**, v. 88, n. 3, p. 263-7, 2002.
- 80 NITTAYANANTA, W.; AMORNTHATREE, K.; KEMAPUNMANUS, M. et al. Expression of oral cytokines in HIV-infected subjects with long-term use of antiretroviral therapy. **Oral Dis**, v. 20, n. 3, p. 57-64, 2014.
- 81 NOGUERA-JULIAN, M.; GUILLÉN, Y.; PETERSON, J., et al. Oral microbiome in HIV-associated periodontitis. **Medicine (Baltimore)**, v. 96, n. 12, p. e5821, 2017.
- 82 NORO-FILHO, G. A.; SALGADO, D. M.; CASARIN, R. C. et al. Anti-infective periodontal therapy promoting improvement in systemic markers of HIV infection. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 29, n. 7, p. 1040-4, 2013.
- 83 ODDEN, K.; SCHENCK, K.; KOPPANG, H. et al. Candidal infection of the gingiva in HIV-infected persons. **J Oral Pathol Med**, v. 23, n. 4, p. 178-183, 1994.

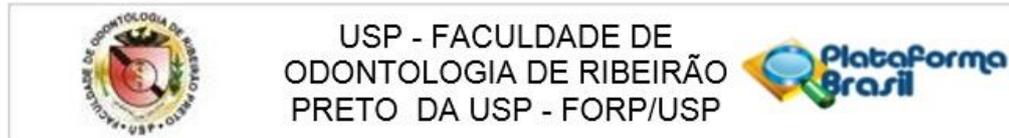
- 84 OLIVER, R. C.; BROWN, L. J.; LOE, H. Periodontal diseases in the United States population. **J Periodontol**, v. 69, n. 2, p. 269-278, 1998.
- 85 OZDEMIR, B.; OZCAN, G.; KARADUMAN, B. et al. Lactoferrin in gingival crevicular fluid and peripheral blood during experimental gingivitis. **Eur J Dent**, v. 3, n. 1, p. 16-13, 2009.
- 86 PANTALEO, G. & FAUCI, A. S. Immunopathogenesis of HIV infection. **Annu Rev Microbiol**, v. 50, n. p. 825-854, 1996.
- 87 PALELLA JR, F. J.; DELANEY, K. M.; MOORMAN, A. C., et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. **N Engl J Med**, v. 333, n. 13, p. 853-60, 1998.
- 88 PATTON, L. L.; MCKAIG, R.; STRAUSS, R., et al. Changing prevalence of oral manifestations of human immunodeficiency virus in the era of protease inhibitor therapy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 89, n. 3, p. 299-304, 2000.
- 89 PEREIRA, V. T.; PAVAN, P; SOUZA, R. C. et al. The association between detectable plasmatic human immunodeficiency virus (HIV) viral load and different subgingival microorganisms in Brazilian adults with HIV: a multilevel analysis. **J Periodontol**, v. 85, n. 5, p. 697-705, 2014.
- 90 REYNAUD, A. H.; NYGAARD-OSTBY, B.; BOYGARD, G. K. et al. Yeasts in periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 28, n. 9, p. 860-4, 2001.
- 91 RILEY, C.; LONDON, J. P.; BURMEISTER, J. A. Periodontal health in 200 HIV-positive patients. **J Oral Pathol Med**, v. 21, n. 3, p. 124-127, 1992.
- 92 ROBINSON, P. G.; SHEIHAM, A.; CHALLACOMBE, S. J., et al. The periodontal health of homosexual men with HIV infection: A controlled study. **Oral Dis**, v. 2, n. 1, p. 45-52, 1996.
- 93 RYDER, M. I.; NITTAYANANTA, W.; COOGAN, M., et al. Periodontal disease in HIV/AIDS. **Periodontol 2000**, v. 60, n. 1, p. 78-97, 2012.

- 94 SAMARANAYAKE, L. P.; MACFARLANE, T. W.; LAMEY, P. J., et al. A comparison of oral rinse and imprint sampling techniques for the detection of yeast, coliform and *Staphylococcus aureus* carriage in the oral cavity. **J Oral Pathol**, v. 15, n. 7, p. 386-388, 1986.
- 95 SANGEORZAN, J. A.; BRADLEY, S. F.; HE, X. et al. Epidemiology of oral candidiasis in HIV-infected patients: colonization, infection, treatment, and emergence of fluconazole resistance. **Am J Med**, v. 97, n. 4, p. 339-346, 1994.
- 96 SANTOS-OLIVEIRA, J. R.; REGIS, E. G.; GIACOIA-GRIPP, C. B., et al. Microbial translocation induces an intense proinflammatory response in patients with visceral leishmaniasis and HIV type 1 coinfection. **J Infect Dis**, v. 208, n. 1, p. 57-66, 2013.
- 97 SARDI, J. C.; DUQUE, C.; MARIANO, F. S. et al. *Candida* spp in periodontal disease: a brief review. **J Oral Sci**, v. 52, n. 2, p. 177-85, 2010.
- 98 SCHEUTZ, F.; MATEE, M. I.; ANDSAGER, L. et al. Is there an association between periodontal condition and HIV infection? **J Clin Periodontol**, v. 24, n. 8, p. 580-587, 1997.
- 99 SHARPSTONE, D.; NEIL, P.; CRANE, R. et al. Small intestinal transit, absorption and permeability in patients with AIDS with and without diarrhoea. **Gut**, v. 45, n. 1, p. 70-6, 1999.
- 100 SOCRANSKY, S. S. & HAFFAJEE, A. D. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. **J Periodontol**, v. 63, n. 4 Suppl, p. 322-331, 1992.
- 101 SPEAR, G. T.; ALVES, M. E.; COHEN, M. H. et al. Relationship of HIV RNA and cytokines in saliva from HIV-infected individuals. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 45, n. 2, p. 129-39, 2005.
- 102 TELES, R. P.; LIKHARI, V.; SOCRANSKY, S. S., et al. Salivary cytokine levels in subjects with chronic periodontitis and in periodontally healthy individuals: A cross-sectional study. **J Periodontal Res**, v. 44, p. 411-17, 2009.

- 103 THUNELL, D. H.; TYMKIW, K. D.; JOHNSON, G. K., et al. A multiplex immunoassay demonstrates reductions in gingival crevicular fluid cytokines following initial periodontal therapy. **J Periodontal Res**, v. 45, n. 1, p. 148-152, 2010.
- 104 TORRES, S. R.; GARZINA-DEMO, A.; MEILLER, T. F., et al. Salivary histatin-5 and oral fungal colonisation in HIV+ individuals. **Mycoses**, v. 52, n. 1, p. 11-5, 2008.
- 105 TSAI, C. C.; KAO, C. C.; CHEN, C. C. Gingival crevicular fluid lactoferrin levels in adult periodontitis patients. **Aust Dent J**, v. 43, p. 40-4, 1998.
- 106 TSAI, C. C.; HO, Y. P.; CHEN, C. C. Levels of interleukin-1 beta and interleukin-8 in gingival crevicular fluids in adult periodontitis. **J Periodontol**, v. 66, n. 10, p. 852-9, 1995.
- 107 TURNER, M. D.; NEDJAI, B.; HURST, T., et al. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1843, n. 11, p. 2563-2582, 2014.
- 108 VAN DYKE, T. E. & VAN WINKELHOFF, A. J. Infection and inflammatory mechanisms. **J Periodontol**, v. 84, n. 4-Suppl., p. S1-7, 2013.
- 109 VALENTINE, J.; SALADYANANT, T.; RAMSEY, K., et al. Impact of periodontal intervention on local inflammation, periodontitis, and HIV outcomes. **Oral Dis**, v. 1, p. 87-97, 2016.
- 110 VERGNON-MISZCZYCHA, D.; LUCHT, F.; ROBLIN, X. et al. Key role played by the gut associated lymphoid tissue during human immunodeficiency virus infection. **Med Sci (Paris)**, v. 31, n. 12, p. 1092-101, 2015.
- 111 UNAIDS. Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS. Disponível em: https://unaid.org.br/wp-content/uploads/2017/12/UNAIDSBR_FactSheet.pdf. Acessado em: fevereiro 17, 2018.
- 112 WEI, P. F.; HO, K. Y.; HO, Y. P. et al. The investigation of glutathione peroxidase, lactoferrin, myeloperoxidase and interleukin-1beta in gingival crevicular fluid: implications for oxidative stress in human periodontal disease. **J Periodontal Res**, v. 39, n. 5, p. 287-93, 2004.

- 113 WHO. World Health Organization HIV/AIDS. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/en/>. Acessado em 15 de novembro de 2017.
- 114 WILLIAMS, R. C. & OFFENBACHER, S. Periodontal medicine: the emergence of a new branch of periodontology. **Periodontol** 2000. v. 23, p. 9-12, 2000.
- 115 YADAV, N.; LAMBA, A. K.; THAKUR, A. et al. Effect of periodontal therapy on lactoferrin levels in gingival crevicular fluid. **Aust Dent J**, v. 59, n. 3, p. 314-20, 2014.
- 116 ZEVIN, A. S.; MCKINNON, L.; BURGNER, A. et al. Microbial translocation and microbiome dysbiosis in HIV-associated immune activation. **Curr Opin HIV AIDS**, v. 11, n. 2, p. 182-90, 2016.

ANEXO A


PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Determinação de fatores envolvidos na patogênese da doença periodontal em pacientes infectados pelo HIV

Pesquisador: Alan Grupioni Lourenço

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 50004415.1.0000.5419

Instituição Proponente: Universidade de Sao Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Parcial

Detalhe:

Justificativa: Envio em anexo o relatório parcial para apreciação do comitê de ética e pesquisa

Data do Envio: 17/12/2017

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.452.277

Apresentação da Notificação:

Relatório parcial.

Objetivo da Notificação:

Relatório parcial.

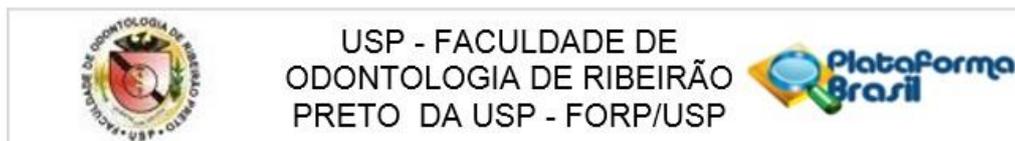
Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os mesmos descritos inicialmente.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

A notificação informa que serão incluídos novos pesquisadores (aluno **Atila Vinicius Vitor Nobre**) e que a responsabilidade do projeto de pesquisa será da aluna de pós graduação Tabata Larissa Santos Polvora. Solicita prorrogação de prazo por seis meses.

Endereço: Avenida do Café s/nº
Bairro: Monte Alegre **CEP:** 14.040-904
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3315-0493 **Fax:** (16)3315-4102 **E-mail:** cep@forp.usp.br



Continuação do Parecer: 2.452.277

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados

Recomendações:

Aprovado. O pesquisador responsável atual deverá fazer uma Emenda ao projeto na Plataforma Brasil e inserir a alteração de responsabilidade, inserir o nome dos novos pesquisadores e alterar o cronograma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovar a solicitação de alteração de pesquisador ad-referendum

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Parcial	relatorio_parcial.pdf	17/12/2017 13:11:49	Alan Grupioni Lourenço	Postado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 21 de Dezembro de 2017

Assinado por:
Simone Cecilio Hallak Regalo
(Coordenador)

Endereço: Avenida do Café s/nº
 Bairro: Monte Alegre CEP: 14.040-904
 UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
 Telefone: (16)3315-0493 Fax: (16)3315-4102 E-mail: cep@forp.usp.br

ANEXO B



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dirigido ao indivíduo infectado pelo HIV

Nós, Átila Vinicius Vitor Nobre, Tábata Larissa Santos Pólvora, Alan Grupioni Lourenço, Leticia Richard Miranda Silva, Vanessa de Oliveira Teles, Camila Tirapelli e Ana Carolina Fragoso Motta solicitamos ao Sr.(a) _____

autorização para coletar sua saliva, seu fluido crevicular gengival (líquido que sai entre a gengiva e o dente), enxágue bucal (bochecho com uma substância um pouco salgada, chamada de PBS) e biópsia de tecido gengival (Caso o senhor(a) necessite de cirurgia periodontal, e somente se realmente existir tal indicação) para a pesquisa: **Determinação de fatores envolvidos na patogênese da doença periodontal em pacientes infectados pelo HIV**. Este trabalho quer avaliar quais são as características da periodontite crônica (doença da gengiva que leva ao amolecimento dos dentes) em indivíduos infectados e não infectados pelo HIV, quais são os fatores que causam piora ou melhora da periodontite crônica, e se há alguma substância na gengiva, na saliva, no fluido crevicular gengival e no enxaguado bucal que está relacionada com o aparecimento ou gravidade da doença periodontal nessas pessoas. Esta avaliação será feita por meio de: perguntas sobre sua saúde; exame de sua boca; biópsia de 5 milímetros da área com periodontite crônica (caso o senhor precise retirar o excesso gengival durante seu tratamento periodontal, será feita anestesia, seguida de um pequeno corte com lâmina de bisturi, remoção do fragmento e depois realização de sutura - ponto); coleta de sua saliva (cuspir em um pote durante 5 minutos); e coleta do seu fluido crevicular gengival (para isso, colocaremos de uma tirinha de papel entre o dente e a gengiva) e estudo destas amostras em laboratório. Esta pesquisa poderá ajudar no entendimento do porquê da periodontite crônica ser mais comum e mais graves em pacientes soropositivos para o HIV. Todos os dados relacionados com o Sr. (a) serão confidenciais e sua identidade será mantida em sigilo. A divulgação dos resultados deste trabalho será realizada por meio da publicação em uma revista científica que será selecionada quando terminarmos o estudo.

Os riscos previsíveis à sua saúde em consequência desta pesquisa são mínimos, como por exemplo, discreta secura de boca imediatamente após cuspir a saliva; isso volta ao normal poucos minutos depois da coleta. Entretanto, garantimos as indenizações necessárias em caso eventual de danos, e o ressarcimento de despesas (transporte, alimentação e outras despesas) decorrentes da participação na pesquisa, nos termos da Resolução CNS 466/2012. Os pesquisadores que entrarão em contato com o Sr. (a), caso necessário, serão: **Átila Vinicius Vitor Nobre, Tábata Larissa Santos Pólvora, Alan Grupioni Lourenço, Leticia Richard Miranda Silva, Vanessa de Oliveira Teles, Camila Tirapelli e Ana Carolina Fragoso Motta**. E o Sr. (a) poderá fazer contato com a equipe por meio dos telefones pessoais citados abaixo e também pelo telefone da clínica de atendimento: **Clínica de Pacientes Especiais: 16-3315-4021** (terças-feiras manhã e quartas-feiras manhã e tarde). Como benefícios, estes exames ajudarão a definir as características da periodontite crônica em pacientes infectados e não infectados pelo HIV, e poderá ajudar a outros pacientes e profissionais a lidar com o tratamento desta doença periodontal. A sua autorização não é obrigatória, e o Sr.(a) poderá desistir a qualquer momento, retirando o seu consentimento. A não autorização deste trabalho não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP.

Você receberá uma via deste termo, com o contato de cada pesquisador e da secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da FORP/USP. Caso tenha alguma dúvida sobre o estudo, o Sr.(a) poderá entrar em contato com os pesquisadores a qualquer momento, antes, durante ou após a realização da pesquisa. Além disso, Sr.(a) terá tempo necessário para refletir e consultar familiares ou outras pessoas de sua confiança para avaliar se deseja ou não participar da pesquisa.

Este documento será assinado pelos pesquisadores **Átila Vinicius Vitor Nobre, Tábata Larissa Santos Pólvora, Alan Grupioni Lourenço, Leticia Richard Miranda Silva, Vanessa**



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

de Oliveira Teles, Camila Tirapelli e Ana Carolina Fragoso Motta, e caso haja mais de uma página, as primeiras páginas devem ser rubricadas e a última assinada por todos os pesquisadores e pelo Sr.(a). Além disso, os dados obtidos neste protocolo não serão usados em outra pesquisa sem novo consentimento do Sr. (a).

Em caso de insatisfações ou reclamações, você poderá entrar em contato com a secretária do CEP, e seu nome será mantido em anonimato.

Secretária do CEP: Endereço do CEP: Av. do Café s/ n°, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP, Monte Alegre, Ribeirão Preto-SP, 14.040-904; Telefone: (16) 3315-0493; e-mail: cep@forp.usp.br; horário de atendimento: de 2ª a 6ª feira, das 8 às 12horas.

Ribeirão Preto-SP, _____ de _____ de _____

Alan Grupioni Lourenço
CPF: 294408248-59; Tel: 16-3315-4021
Pesquisador responsável

Ana Carolina Fragoso Motta
CPF: 678.014.555-68; Tel: 16-3315-4067
Pesquisadora participante

Átila Vinícius Vitor Nobre
CPF: 030.039.723-24; Tel: 16-98107-6515
Pesquisador responsável

Tábata Larissa Santos Pólvora
CPF: 111.760.767-44; Tel: 27-99279-8387
Pesquisadora participante

Letícia Richard Miranda Silva
CPF: 400.988.248-48; Tel: 16-981104959
Pesquisadora participante

Vanessa de Oliveira Teles
CPF: 419.008.308-92; Tel: 16-992242651
Pesquisadora participante

Camila Tirapelli
CPF: 200.582.248-58; Tel: 16-3315-3172
Pesquisador participante

(Participante da pesquisa)

RG: _____ Telefone: _____
Endereço: _____



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dirigido ao indivíduo não infectado pelo HIV

Nós, Átila Vinícius Vitor Nobre, Tábata Larissa Santos Pólvora, Alan Grupioni Lourenço, Leticia Richard Miranda Silva, Vanessa de Oliveira Teles, Camila Tirapelli e Ana Carolina Fragoso Motta solicitamos ao Sr.(a) _____

autorização para coletar sua saliva, seu fluido crevicular gengival (líquido que sai entre a gengiva e o dente), enxágue bucal (bochecho com uma substância um pouco salgada, chamada de PBS) e biópsia de tecido gengival (Caso o senhor(a) necessite de cirurgia periodontal, e somente se realmente existir tal indicação) para a pesquisa: **Determinação de fatores envolvidos na patogênese da doença periodontal em pacientes infectados pelo HIV**. Este trabalho quer avaliar quais são as características da periodontite crônica (doença da gengiva que leva ao amolecimento dos dentes) em indivíduos infectados e não infectados pelo HIV, quais são os fatores que causam piora ou melhora da periodontite crônica, e se há alguma substância na gengiva, na saliva, no fluido crevicular gengival e no enxaguado bucal que está relacionada com o aparecimento ou gravidade da doença periodontal nessas pessoas. Esta avaliação será feita por meio de: perguntas sobre sua saúde; exame de sua boca; biópsia de 5 milímetros da área com periodontite crônica (caso o senhor precise retirar o excesso gengival durante seu tratamento periodontal, será feita anestesia, seguida de um pequeno corte com lâmina de bisturi, remoção do fragmento e depois realização de sutura - ponto); coleta de sua saliva (cuspir em um pote durante 5 minutos); e coleta do seu fluido crevicular gengival (para isso, colocaremos de uma tirinha de papel entre o dente e a gengiva) e estudo destas amostras em laboratório. Mesmo que o estudo esteja preocupado em estudar a doença periodontal em pessoas com o HIV, é muito importante também conhecermos esses fatores em pessoas não infectadas pelo o HIV, como o senhor(a). Para que possamos comparar a doença periodontal tanto em pacientes com HIV quanto naqueles sem o HIV, só assim entenderemos as diferenças do comportamento da periodontite em pessoas com o HIV. Esta pesquisa poderá ajudar no entendimento do porquê da periodontite crônica ser mais comum e mais graves em pacientes soropositivos para o HIV. Todos os dados relacionados com o Sr. (a) serão confidenciais e sua identidade será mantida em sigilo. A divulgação dos resultados deste trabalho será realizada por meio da publicação em uma revista científica que será selecionada quando terminarmos o estudo.

Os riscos previsíveis à sua saúde em consequência desta pesquisa são mínimos, como por exemplo, discreta secura de boca imediatamente após cuspir a saliva; isso volta ao normal poucos minutos depois da coleta. Entretanto, garantimos as indenizações necessárias em caso eventual de danos, e o ressarcimento de despesas (transporte, alimentação e outras despesas) decorrentes da participação na pesquisa, nos termos da Resolução CNS 466/2012. Os pesquisadores que entrarão em contato com o Sr. (a), caso necessário, serão: **Átila Vinícius Vitor Nobre, Tábata Larissa Santos Pólvora, Alan Grupioni Lourenço, Leticia Richard Miranda Silva, Vanessa de Oliveira Teles, Camila Tirapelli e Ana Carolina Fragoso Motta**. E o Sr. (a) poderá fazer contato com a equipe por meio dos telefones pessoais citados abaixo e também pelo telefone da clínica de atendimento: **Clinica de Pacientes Especiais: 16-3315-4021** (terças-feiras manhã e quartas-feiras manhã e tarde). Como benefícios, estes exames ajudarão a definir as características da periodontite crônica em pacientes infectados e não infectados pelo HIV, e poderá ajudar a outros pacientes e profissionais a lidar com o tratamento desta doença periodontal. A sua autorização não é obrigatória, e o Sr.(a) poderá desistir a qualquer momento, retirando o seu consentimento. A não autorização deste trabalho não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Você receberá uma via deste termo, com o contato de cada pesquisador e da secretária do Comitê de Ética em Pesquisa da FORP/USP. Caso tenha alguma dúvida sobre o estudo, o Sr.(a) poderá entrar em contato com os pesquisadores a qualquer momento, antes, durante ou após a realização da pesquisa. Além disso, Sr.(a) terá tempo necessário para refletir e consultar familiares ou outras pessoas de sua confiança para avaliar se deseja ou não participar da pesquisa.

Este documento será assinado pelos pesquisadores **Átila Vinicius Vitor Nobre, Tábata Larissa Santos Pólvora, Alan Grupioni Lourenço, Leticia Richard Miranda Silva, Vanessa de Oliveira Teles, Camila Tirapelli e Ana Carolina Fragoso Motta**, e caso haja mais de uma página, as primeiras páginas devem ser rubricadas e a última assinada por todos os pesquisadores e pelo Sr.(a). Além disso, os dados obtidos neste protocolo não serão usados em outra pesquisa sem novo consentimento do Sr. (a).

Em caso de insatisfações ou reclamações, você poderá entrar em contato com a secretária do CEP, e seu nome será mantido em anonimato.

Secretária do CEP: Endereço do CEP: Av. do Café s/nº, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP, Monte Alegre, Ribeirão Preto-SP, 14.040-904; Telefone: (16) 3315-0493; e-mail: cep@forp.usp.br; horário de atendimento: de 2ª a 6ª feira, das 8 às 12horas.

Ribeirão Preto-SP, _____ de _____ de _____

Alan Grupioni Lourenço
CPF: 294408248-59; Tel: 16-3315-4021
Pesquisador responsável

Ana Carolina Fragoso Motta
CPF: 678.014.555-68; Tel: 16-3315-4067
Pesquisadora participante

Átila Vinicius Vitor Nobre
CPF: 030.039.723-24; Tel: 16-98107-6515
Pesquisador responsável

Tábata Larissa Santos Pólvora
CPF: 111.760.767-44; Tel: 27-99279-8387
Pesquisadora participante

Leticia Richard Miranda Silva
CPF: 400.988.248-48; Tel: 16-981104959
Pesquisadora participante

Vanessa de Oliveira Teles
CPF: 419.008.308-92; Tel: 16-992242651
Pesquisadora participante

Camila Tirapelli
CPF: 200.582.248-58; Tel: 16-3315-3172
Pesquisador participante

(Participante da pesquisa)

RG: _____ Telefone: _____
Endereço: _____

ANEXO C



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROTOCOLO DE INVESTIGAÇÃO CLÍNICA

1. IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____ Idade _____
 Data de nasc.: _____ Sexo: _____ Raça: _____ Estado Civil: _____
 Naturalidade: _____ Nacionalidade: _____ Escolaridade: _____
 End.Residencial _____ N°: _____
 Bairro: _____ Cidade: _____ Estado _____ CEP: _____
 Profissão: _____ Local de trabalho: _____
 Tel.Residencial _____ Tel. Recado: _____ Tel.Comercial: _____
 Mãe: _____ Naturalidade: _____
 Pai: _____ Naturalidade: _____
 Identidade (RG): _____ CNS: _____
 Registro FORP: _____ Registro HC: _____
 Aluno (a): _____ Data da consulta inicial: _____

2. ANAMNESE

Queixa principal: _____

 História da doença atual: _____

3. Questionário de saúde

HISTÓRIA MÉDICA.

1. Está sobre tratamento médico: _____ Sim _____ Não. Há quanto tempo? _____
2. ___ Perdeu ou ___ ganhou peso nos últimos meses?
3. Tem manchas ou lesões na pele? ___ Sim ___ Não.
4. Costuma ter ínguas (gânglios infartados) em alguma região do corpo? ___ Sim ___ Não.
5. Tem o hábito de fumar? ___ Sim ___ Não. Quantos cigarros/dia?
6. Tem o hábito de ingerir bebidas alcoólicas? ___ Sim ___ Não. Com qual frequência?

Sobre a AIDS:

7. É soropositivo? ___ Sim ___ Não. Categoria da Aids: _____
8. Qual é o tempo de soropositividade? _____ anos.
9. Qual foi o tipo de exposição à contaminação?
10. Está tomando algum medicamento? ___ Sim ___ Não.
Qual _____

11. Faz uso de antiretrovirais? ___ Sim ___ Não. Quais? _____

12. Teor de LT CD-4⁺ (últimos 3 meses)

13. Qual a carga viral?

14. Apresenta ou já apresentou alguma dessas manifestações sistêmicas:

- | | |
|---|----------------------------|
| ___ Pneumonia por <i>Pneumocystis carinii</i> | ___ Candidíase. |
| ___ Criptococose | ___ Histoplasmose |
| ___ Tuberculose | ___ Micobacteriose atípica |
| ___ Doença periodontal | ___ Úlceras aftóides |
| ___ Infecção por Citomegalovírus | ___ Herpes simples |
| ___ Herpes Zoster | ___ Toxoplasmose |
| ___ Estrongiloidíase pulmonar ou disseminada | |

15. Achados ginecológicos:

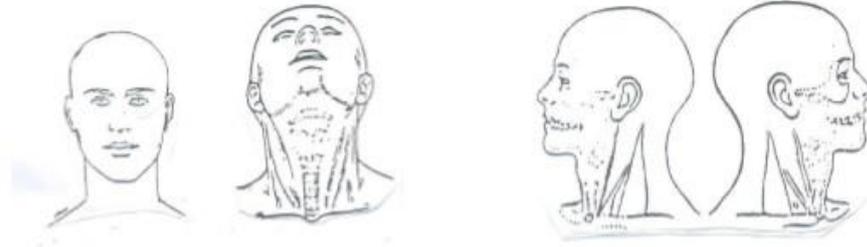
16. Achados urológicos:

História Estomatológica.

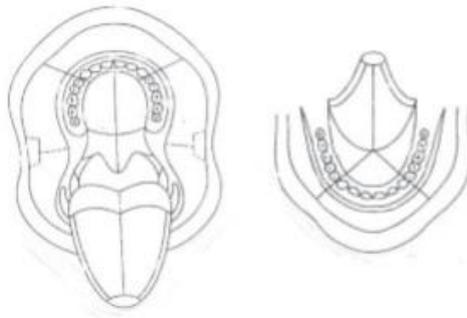
17. Costuma ter placas brancas na boca ___ Sim ___ Não.
18. Sente sua gengiva irritada? ___ Sim ___ Não.
19. Sente seus dentes abaulados? ___ Sim ___ Não
20. Já realizou algum tipo de tratamento periodontal? ___ Sim ___ Não.
21. Faz controle periódico de placa e cálculo? ___ Sim ___ Não.
22. Faz o uso do fio dental? ___ Sim ___ Não
23. Está satisfeito com sua saúde oral? ___ Sim ___ Não
24. Teve alguma lesão na boca recentemente? ___ Sim ___ Não.
25. Faz uso de Prótese? ___ Total ___ PPR ___ Fixa ___ Implantes.
26. Existe alguma informação importante que não foi perguntada?
27. Observações: _____

4. EXAME FÍSICO

EXAME LOCOREGIONAL/EXTRABUCAL:



EXAME INTRABUCAL:



PERIODONTO – Periodontal Screening and Recording – PSR

Código	Características	Conduta
0	Ausência de sangramento à sondagem, cálculo e excesso de margens restauradoras.	Medidas preventivas
1	Sangramento à sondagem, ausência de cálculo e excessos de margens restauradoras.	Controle de biofilme dentário pelo profissional e instrução de higiene oral.
2	Sangramento à sondagem, presença de cálculo supra e/ou subgingival e/ou excessos de margens restauradoras.	Raspagem e polimento dentário, remoção dos excessos de restaurações e instrução de higiene oral.
3	Presença de bolsa periodontal de 3,5 a 5,5mm	Exame periodontal complementar e radiografias no sextante envolvido; necessidade de tratamento periodontal especializado
4	Presença de bolsa periodontal acima de 5,5mm	
*	Envolvimento de furca, mobilidade, perda de gengiva inserida e recessão gengival acima de 3,5mm	

PSR: _____

ÍNDICE DE BIOFILME DENTAL:

18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
<input type="checkbox"/>															
<input type="checkbox"/>															
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38

EXAME DE DENTES – CPO-D:

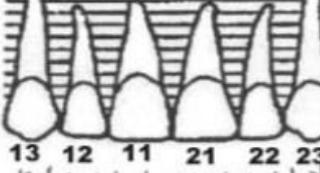
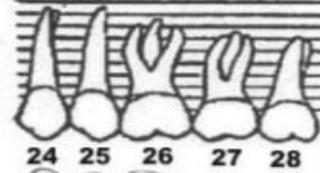
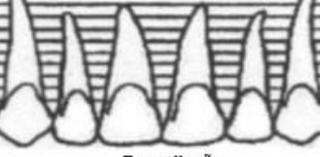
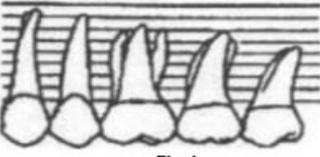
18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
<input type="checkbox"/>															
<input type="checkbox"/>															
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38

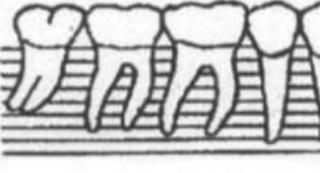
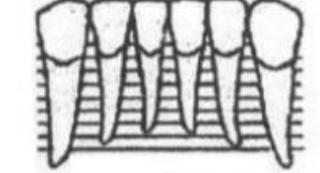
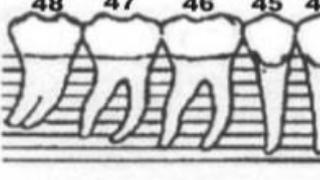
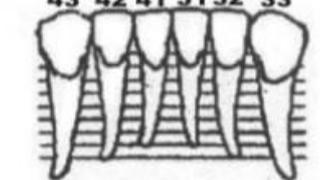
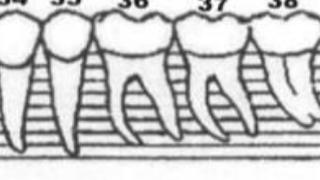
ESTADO DE REABILITAÇÃO: indicar se prótese unitária fixa, adesiva, PPR, PT, implante, etc.

18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
<input type="checkbox"/>															
<input type="checkbox"/>															
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38

Periodontograma

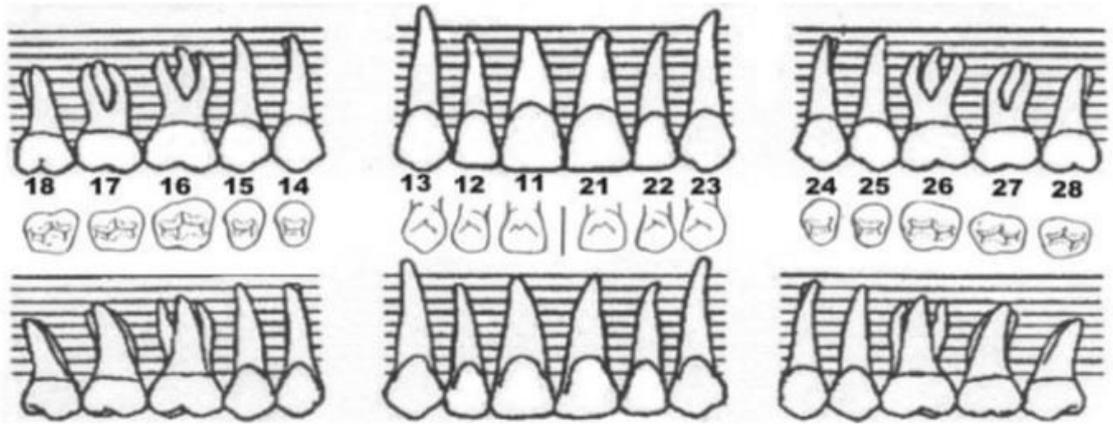
Estado atual em: ____/____/____

	Inicial	Reavaliação	Final																								
JCE - MG	<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>									<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>									<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>								
PS-SS	<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>									<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>									<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>								
NCI	<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>									<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>									<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>								
Vestibular																											
Palatina																											

	Inicial	Reavaliação	Final																								
JCE - MG	<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>									<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>									<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>								
PS-SS	<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>									<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>									<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>								
NCI	<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>									<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>									<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>								
Vestibular																											
Lingual																											

SS = ____%

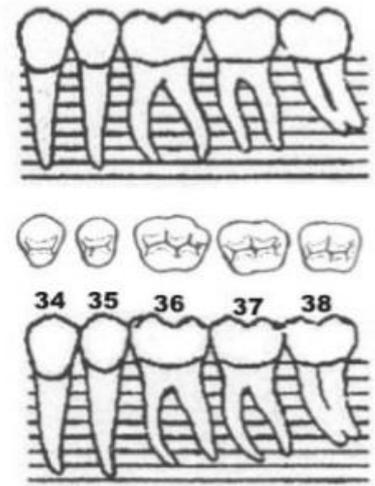
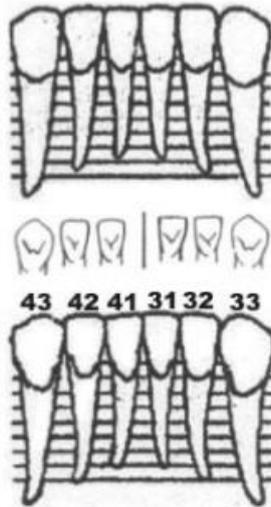
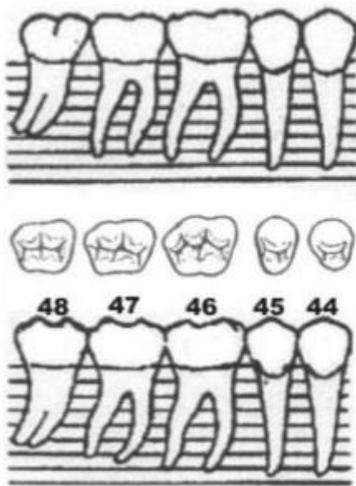
TRATAMIENTO REALIZADO



JCE - MG

PS-SS

NCI



Legenda: Tratamento a ser realizado Tratamento executado

ANEXO D

Tabela 8. Parâmetros clínicos periodontais ajustados por sexo, idade e número de dentes (pós-teste de Tukey-Kramer).

Grupos experimentais (Média / Ep)				Comparação inter-grupos (Unpaired t test)		
Variável	Tempo	Grupo teste (n=22)	Grupo controle (n=20)	Diferença entre as médias	95% IC	Valor de <i>p</i>
PS (mm)	<i>Tempo 0</i>	2,78 Ep=0,12	2,90 Ep=0,13	-0,11	-0,68 – 0,45	0,9914
	<i>Tempo 2</i>	2,16 Ep=0,12	2,56 Ep=0,13	-0,40	-0,96 – 0,16	0,3123
	<i>Tempo 3</i>	1,94 Ep=0,12	2,36 Ep=0,13	-0,43	-0,99 – 0,13	0,2410
NIC (mm)	<i>Tempo 0</i>	3,03 Ep=0,17	3,42 Ep=0,18	-0,39	-0,117 – 0,38	0,6761
	<i>Tempo 2</i>	2,59 Ep=0,17	3,14 Ep=0,18	-0,55	-0,133 – 0,22	0,3049
	<i>Tempo 3</i>	2,50 Ep=0,17	2,98 Ep=0,18	-0,48	-1,25 – 0,30	0,4731

Ep: erro padrão; DP = desvio padrão; 95% IC = 95% de intervalo de confiança; PS = profundidade de sondagem; NIC = nível de inserção clínica



Effects of non-surgical periodontal therapy on the clinical and immunological profile and *Candida* spp oral colonization of HIV-infected patients with chronic periodontitis

Journal:	<i>Journal of Periodontology</i>
Manuscript ID	JOP-18-0197
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	27-Mar-2018
Complete List of Authors:	<p>Nobre, Átila; Universidade de Sao Paulo Campus de Ribeirao Preto, Department of Oral Surgery and Periodontology; University of Sao Paulo Pólvora, Tábata; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Odontologia, Department of Stomatology</p> <p>Silva, Letícia; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Odontologia de Ribeirao Preto, Department of Stomatology, Public Oral Health and Forensic Dentistry</p> <p>Teles, Vanessa; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Odontologia de Ribeirao Preto, Department of Stomatology, Public Oral Health and Forensic Dentistry</p> <p>Silva, Gilberto; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Odontologia de Ribeirao Preto, Department of Stomatology, Public Oral Health and Forensic Dentistry</p> <p>Polizel, Ana ; Universidade de Sao Paulo Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina de Ribeirao Preto, Dentistry and Stomatology Division</p> <p>de Macêdo, Leandro; Universidade de Sao Paulo Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina de Ribeirao Preto, Dentistry and Stomatology Division</p> <p>da Fonseca, Benedito; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Medicina de Ribeirao Preto, Medical Clinic Department</p> <p>Tirapelli, Camila; University of São Paulo, School of Dentistry of Ribeirão Preto (FORP/USP) ,, Integrated Dental Clinic, Dental Materials and Prosthodontics; Camila Tirapelli,</p> <p>Saraiva, Maria; School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Department of Pediatrics and Social Dentistry</p> <p>Grupioni, Alan; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Odontologia de Ribeirao Preto, Department of Morphology, Physiology and Patology</p> <p>Motta, Ana Carolina; School of Dentistry, Oral Diagnosis</p>
Key Words:	Non-surgical periodontal therapy, HIV, Cytokine(s), Inflammation and innate immunity, Periodontitis

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

Title page

Manuscript title: Effects of non-surgical periodontal therapy on the clinical and immunological profile and *Candida spp* oral colonization of HIV-infected patients with chronic periodontitis

Short running title: Non-surgical periodontal therapy in HIV infected patients

List of authors

Átila V. V. Nobre^{*} DDS; Tábata L. S. Pólvara[†] DDS; Letícia R. M. Silva[‡] DDS; Vanessa de O. Teles[‡] DDS; Gilberto A. Silva[‡] MsC; Ana Laura P. Ranieri[§] MsC; Leandro D. de Macedo[§] PhD; Benedito A. L. da Fonseca^{||} PhD; Camila Tirapelli[¶] PhD; Maria C. Saraiva[#] PhD; Alan G. Lourenço^{**} PhD; Ana Carolina F. Motta[‡] PhD

Author affiliations

^{*}Department of Oral & Maxillofacial Surgery, and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Av. do Café, s/n, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

[†]Department of Stomatology, School of Dentistry, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

[‡]Department of Stomatology, Public Oral Health and Forensic Dentistry, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Av. do Café, s/n, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

[§]Divison of Dentistry of Clinicals Hospital of School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Av. do Café, s/n, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

^{||}Department of Medical Clinic of School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Av. do Café, s/n, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

[¶]Department of Dental Materials and Prosthodontics, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Av. do Café, s/n, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

1
2
3 #Department of Child Clinic, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São
4 Paulo, Av. do Café, s/n, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

5
6
7 **Department of Morphology, Physiology and Patology, School of Dentistry of Ribeirão
8 Preto, University of São Paulo, Av. do Café, s/n, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

9
10
11
12
13 **Corresponding author:** Átila Vinícius Vitor Nobre

14
15 Address: Department of Oral & Maxillofacial Surgery, and Periodontology, School of
16 Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Av. do Café, s/n, Ribeirão Preto,
17 SP, Brazil. Postal code: 14040-904

18
19
20 Phone/Fax: +55 – 16 – 3315-4788

21
22 E-mail address: atilavnobre@hotmail.com

23
24
25
26
27
28 **Disclosure of conflict of interests**

29
30 The authors state that they have no conflict of interests.

31
32
33
34
35 **Word, figure, table and references count**

36
37 3.779 words, 4 figures, 2 tables and 50 references.

38
39
40
41
42 **Key findings:** Chronic periodontitis in HIV-infected individuals in the post-antiretroviral
43 therapy era is similar to that observed in systemically healthy individuals, although it
44 has higher salivary levels of interleukin (IL) -6 and -8, tumor necrosis factor alpha and
45 oral colonization by *Candida spp*. Non-surgical periodontal therapy showed beneficial
46 effects on periodontal clinical parameters and oral colonization by *Candida spp* in HIV-
47 infected and non-infected patients with chronic periodontitis and in the immunological
48 parameters of HIV infection.

49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abstract

Background: Studies about clinical and immunological profile of individuals infected by human immunodeficiency virus (HIV) with chronic periodontitis (CP) after the introduction of antiretroviral therapy (ART) have produced conflicting results. This study investigated the impact non-surgical periodontal therapy (NSPT) on the clinical and immunological features of CP in infected and non-HIV-infected individuals.

Methods: Adults patients HIV-infected (test group) and non-HIV-infected (control group) with CP were selected. Gingival index (GI), probing depth (PD), clinical attachment level (CAL), number of teeth, CD4+ T lymphocytes and viral load [only for test group], salivary cytokines: interleukin (IL)-6, IL-8 and tumoral necrosis factor-alpha (TNF- α), and *Candida spp* count and species were monitored at baseline, 30 and 90 days after NSPT and statistically analyzed.

Results: Forty-two patients were allocated to one of two groups: HIV infected (test group; n=22) and non-HIV-infected (control group; n=22). Both groups presented decrease in *Candida spp* oral count, GI, PD, IL-6 and IL-8 as well as gain of attachment level after NSPT at 30 and 90 days, furthermore increase CD4+ T lymphocytes and decrease of viral load for test group. Colony forming units (CFU) of *Candida spp* genre and species of *Candida albicans* and IL-6, IL-8 and TNF-a levels was higher in the test group.

Conclusions: CP in HIV-infected individuals in the post-ART era has a similar pattern to non-HIV-infected. Furthermore, NSPT showed beneficial effect on the immunological parameters of HIV infection, as well as reduction on *Candida spp* oral count and salivary levels of IL6 and IL-8 in both groups.

Introduction

Human immunodeficiency virus (HIV) infection, which causes acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), remains a major global public health problem. According to the Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS)¹, there are currently 36.7 million people living with HIV and 1.2 million AIDS-related deaths worldwide. In Brazil, from the beginning of the AIDS epidemic (1980) until June 2017, 882.810 people living with HIV were identified, 316.088 deaths with HIV/AIDS as the underlying cause, and an estimated 40.000 new infections by HIV in the last five years².

The establishment of antiretroviral therapy (ART) in 1995 significantly reduced mortality rates due to HIV-related causes, resulting in the restoration and preservation of immunological functions and consequent increase in the life expectancy of these patients³. Brazil has one of the highest coverage of ART among low and middle-income countries, with 64% of the HIV-infected population receiving ART free of charge. The improvement attributed to ART in the quality of life of these individuals could be extended to the oral cavity by the decrease of HIV-related oral diseases. As HIV infection became a chronic disease, chronic oral inflammatory diseases became a subject of great study interest, especially chronic periodontitis (CP)^{4,5}.

Etiological factor of CP is bacterial biofilm, formed mainly by gram-negative bacteria, has the capacity to influence the host's immune system and cause imbalance in the healthy symbiotic community, resulting in the secretion of inflammatory mediators involved in periodontal destruction, such as interleukin (IL)-6, IL-8 and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)^{6,7}. Recent evidence suggests that CP generates a systemic inflammatory response, which has been associated as a risk factor for worsening of various systemic conditions, including cardiovascular diseases, diabetes mellitus, rheumatoid arthritis and HIV infection⁸. In addition to bacterial infection, fungal infections easily settle in the oral cavity of HIV-infected individuals, due to immunological changes mediated by T lymphocytes⁹. Most fungal infections are caused by fungi of the genre *Candida spp*, which has a commensal relationship with oral cavity, but which assume pathogenicity characteristics due to immunodeficiency⁵. Oral candidiasis is a particularly common problem in HIV-infected individuals, where more than 70% of AIDS patients experience this manifestation throughout the

1
2
3 disease¹⁰. Some studies have suggested the relationship between the presence of
4 *Candida spp* and the pathogenesis of periodontal disease in HIV-infected
5 individuals^{5,11}.
6
7

8 To date, studies on the clinical and immunological profile of HIV-infected
9 patients with CP under ART before and after periodontal therapy have produced
10 conflicting results, probably due to confounding factors such as prolonged use of
11 antibiotics and anti-inflammatories, non-exclusion of conditions modifying periodontal
12 disease, such as diabetes mellitus, smoking, pregnancy and genetic factors¹²⁻¹⁴. Thus,
13 the objective of the present study is to evaluate the effect of non-surgical periodontal
14 therapy (NSPT) on periodontal clinical parameters, salivary cytokine profile and oral
15 colonization by *Candida spp* of HIV-infected individuals with CP.
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Materials and methods

Study design and patients

This was a quasi-experimental trial (NCT03262402) composed of two groups: HIV-infected and non-HIV-infected individuals, both with CP recruited respectively from Special Unit for the Treatment of Infectious Diseases of Clinicals Hospital of the Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Brazil (UETDI-HC-FMRP-USP), and from public service of Ribeirão Preto for periodontal treatment in School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil (FORP-USP) consecutively selected from January 2016 to November 2017. The inclusion criteria were adult patients (≥ 18 years old), diagnosed with CP¹⁶, minimum of 12 teeth and presence of minimum two sites with probing depth (PD) ≥ 5 mm and two teeth with clinical attachment level (CAL) ≥ 5 mm. The exclusion criteria were periodontal therapy or antibiotic treatment in the previous six months, systemic diseases/conditions that could affect progression of periodontitis (e.g., diabetes melitus, hypertension, pregnancy and cardiovascular diseases), extensive prosthetic involvement, long-term administration of anti-inflammatory medication, smoking, orthodontic treatment, use of illicit drugs, cognitive or motor disturbances that may interfere with the patient's oral hygiene care. The protocol was approved by the local Institutional Review Board (CAAE #: 54415.1.000.5419) and all patients provide written informed consent. All HIV-infected individuals had been diagnosed for at least one year by the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) in distinct blood samples confirmed by Western Blot and were in regular use of ART with a nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitor, a nucleoside non-analogous reverse transcriptase inhibitor, an integrase inhibitor and a protease inhibitor. In addition, only HIV-infected individuals with lymphocyte count below 200 cells per cubic millimeter of blood (cells/mm³) were enrolled.

NSPT comprised effective supragingival biofilm control and subgingival SRP. All patients were allocated an oral hygiene program. Periodontal clinical parameters and immunological parameters of HIV infection (for the test group) were assessed at baseline, 30 and 90 days after NSPT.

Examiner Calibration

All clinical parameters were measured by a single, calibrated examiner (AVVN). For calibration, at two separate sessions, 48 hours apart, duplicate measurements of PD and CAL were obtained from 10 patients who were not related to this study and presented at least two pairs of teeth with PD \geq 5 mm in proximal sites. The examiner was considered calibrated when percentage of agreement between repeated measurements, assuming the maximum variation of 1 mm, was \geq 90%. The coefficient of intraclass correlation was used to ensure calibration of the examiner.

Clinical Measurements

All clinical parameters in both groups were recorded at baseline (pre intervention periodontal), 30 and 90 days after NSPT. The dichotomous gingival index (GI)¹⁷. were determined by the presence or absence of presence or absence of bleeding 20 seconds after probing on the four faces of the tooth and were expressed as a percentage of bleeding on the total of tooth surfaces. PD was measured from the free gingival margin to the bottom of the periodontal pocket, and CAL was measured from the cemento-enamel junction to the bottom of the periodontal pocket. PD and CAL were measured at six sites per tooth: 1) mesio-buccal; 2) buccal; 3) disto-buccal; 4) disto-lingual; 5) lingual; and 6) mesio-lingual. All probing measurements were performed using an North Carolina periodontal probe¹.

Saliva collection

Samples of whole saliva were collected at the all studies periods. Participants were instructed not to feed, not drink, not smoke and not brush their teeth one hour before to collection in order to minimize the risk of sample contamination. Participants were instructed to sit, head slightly bent forward, and expectorate the saliva for five minutes, in a bottle placed below the lower lip. All samples were collected between 8 and 10 o'clock in the morning. Samples were immediately taken to the laboratory

¹ UNC Periodontal probe, Hu-Friedy, Chicago, IL.

1
2
3 centrifuged at 4.800g (gravity acceleration) for 30 minutes at 4 degrees Celsius (°C).
4 The saliva was lined in cryotubes and immediately frozen at -80°C until the analyzes¹⁸.
5
6
7

8 *Oral rinse collection*

9

10 *Candida spp* was counted in the samples by the phosphate buffered saline (PBS) oral
11 rinse technique described by Samaranayake¹⁹ at the all studies periods.
12
13
14
15

16 *Laboratory analysis*

17

18 *Oral count of Candida spp*

19

20 Mycological analysis for *Candida spp* was performed using oral rinses, as described in
21 the item *Oral rinse collection*. The rinse samples were diluted in PBS in order to obtain
22 three different concentrations: pure sample; sample ten times diluted; and, sample
23 diluted one hundred times and cultivated in Petri's plaque with Sabouraud Dextrose
24 Agar with Chloramphenicol after incubated in culture oven at 37°C for 48 hours.
25 Positive cultures were counted to determine the number of colony forming units
26 (CFU/ml) and the presumptive identification of the species was made based on the
27 morphology and color of the colonies: green *Candida albicans* (*C. albicans*); and, blue
28 metallic, pink and white (*Candida non-albicans*).
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39

40 *ELISA for IL-6, IL-8 and TNF-α*

41

42 Salivary concentration IL-6, IL-8 and TNF-α was determined by ELISA sandwich type. For
43 this, we used a ELISA Development Kit for IL-6², IL-8³ and TNF-α⁴ according to the
44 manufacturer's instructions. The absorbance was read at 405 nm using ELISA reader
45 (DIATECH).
46
47
48
49
50
51

52 *Immunological Monitoring Associated with HIV-infection*

53

54 ² Recombinant Human IL-6 ELISA Development Kit (Peprotech, New Jersey, USA).

55 ³ Recombinant Human IL-8 ELISA Development Kit (Peprotech, New Jersey, USA).

56 ⁴ Recombinante Human TNF-α ELISA Development Kit (Peprotech, New Jersey, USA).
57
58
59
60

1
2
3 Laboratory analysis of T CD4 lymphocyte and viral load in peripheral blood were
4 routinely performed every months for all patients at Clinicals Hospital. For comparison
5 purposes, the laboratory data of each patient were obtained within the same week that
6 the periodontal clinical examination was performed.
7
8
9

10 11 12 *NSPT*

13
14
15 Periodontal treatment was initiated after baseline collections and instructions for oral
16 hygiene for effective biofilm control, including brushing with the Bass technique²⁰,
17 interproximal cleaning with dental floss, and interdental brushes. SRP of the entire oral
18 cavity was completed within 1 week and was performed by only one periodontist
19 (AVVN), under local anesthesia using manual instruments⁵, ultrasonic devices⁶, and, if
20 necessary, multilaminated drills. Instrumentation was performed quadrant by
21 quadrant until adequate surface quality, assessed by a periodontal probe, was
22 reached. After NSPT, all patients were included in a support periodontal therapy (SPT)
23 program consisting of professional supragingival biofilm control, oral hygiene
24 reinstructions and coronal polishing was provided monthly, and then every 3
25 months. SPT also included updating medical and dental histories, and extra and
26 intraoral exams.
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

41 *Statistical Analyses*

42
43 Statistical analyzes were performed considering two-tailed tests and alpha of 0.05.
44 Descriptive analyzes included point estimators such as means, standard deviations,
45 medians and quartiles (first quartile -Q1 and third quartile -Q3) as needed. Bivariate
46 comparisons between groups at each point in time (without data dependence)
47 included chi-square test or Fisher's exact test for categorical outcomes, and for
48 continuous outcomes parametric tests such as t-test or non-parametric tests (Mann-
49 Whitney). Trends along the study for test and control group separately was tested using
50 mixed models for outcomes with normal distribution and Friedman test for non-
51
52
53
54

55
56 ⁵⁵ Gracey curets, Hu-Friedy, Chicago, IL.

57 ⁶ Bobcat, DENTSPLY/Cavitron, Long Island City, NY.
58
59
60

1
2
3 normal distributions. Comparisons of groups along the study were performed taking
4 into account the dependence of the data over time and adjusting for potential
5 confounder factors (sex, age and tooth loss during the study). Models for clinical
6 outcomes also were adjusted for the number of teeth at baseline. When the
7 endpoints had a normal distribution, analysis of variance of mixed model (random
8 intercept and trend model), considering the individual as a random factor were used.
9 (whenever necessary Tukey-Kramer multiple comparisons were tested). In the case of
10 non-normal distribution, we used variance analysis of mixed models including ANOVAF
11 command and non-structured covariance estimator for each treatment. All analyzes
12 were performed in the SAS 9.1 program.
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Results

Patients

A total of 1.528 medical records of HIV-infected patients were identified and reviewed at the UETDI-HC-FMRP-USP and 80 individuals non-HIV-infected, referred by the public service of Ribeirão Preto, were screened in the FORP-USP (**Figure 1**). Information regarding demographic features, general health, and HIV infection history were obtained from anamnesis questionnaire and patients' medical records. After inclusion and exclusion criteria 22 HIV-infected individuals (test group) and 20 non-HIV-infected (control group), both with CP were selected. The age of individuals ranged from 22 to 75 years-old with mean and (\pm) standard deviation of 46.21 ± 9.75 years-old.

Epidemiological Profile of the Study Population

Test group had a mean age of 44.8 ± 5.8 years; 14 (64%) were male and 08 (35.4%) were female; 68.2% were white, the majority had incomplete primary education (40.9%) and were single (59.1%). 18 patients had some type of opportunistic infection, especially pneumonia (63.6%), oral candidiasis (59.1%) and herpes zoster (40.9%). The control group had mean age of 47.8 ± 12.8 years; 4 (20%) were male and 16 (80%) were female; 95% were white; the majority had completed high school (40%) and were married (80%). The only opportunistic infection detected in this group was oral candidiasis (15%) (**Table 1**).

Epidemiologic characteristics and imunological parameters of the test group

The mean HIV seropositivity time was 13.5 ± 7.2 years and the mean treatment time at UETDI was 10.7 ± 8.5 years. The majority of the patients acquired the HIV infection through sexual relations (63.6%), followed by blood transfusion (4.5%); however, the others were not able to report the form of contamination. There was increase in the CD4 T lymphocyte count and decrease in plasma viral load comparing baseline values and 90 days after NSPT. Regarding ART, the most frequent combination was nucleoside

1
2
3 analogue reverse transcriptase inhibitor + protease inhibitor. The most commonly used
4 drugs were tenofovir (TDF) + lamivudine (3TC) + atazanavir (ATV) (54.5%) (**Table 2**).
5
6
7

8 9 *Periodontal clinical parameters*

10
11 The multivariate analysis controlled for individual variation and control of possible
12 confounders factors, revealed that GI decreased significantly ($p < 0.0001$) for both
13 groups specially 30 days after NSPT for both groups. Regarding CAL, both groups had
14 gain of clinical insertion in all periods analyzed and this was statistically significant
15 ($p < 0.0001$). In relation to the number of teeth, the groups presented similar averages
16 at the baseline (test group = 21.1, control group = 23.6), but there was a greater loss of
17 teeth in the test group. The control group showed stability regarding the number of
18 teeth over time (**Figure 2**).
19
20
21
22
23
24
25

26 27 *Candida spp* oral count and identification of the species

28
29 Regarding the oral count of *Candida spp*, the test group had a higher number of CFUs
30 throughout the study and this was statistically significant ($p = 0.0090$). There was
31 general decrease in CFUs after NSPT for both groups over time ($p < 0.0001$) (**Figure 3**).
32 The species of *Candida spp* in the two groups are characterized as *C. albicans* and
33 *Candida non-albicans*. Regarding the presence of *C. albicans*, the test and control
34 groups were homogeneous, and there was decrease in CFUs comparing baseline and
35 90 days. Regarding *Candida non-albicans*, in the baseline, the groups were
36 homogeneous, but in the 30 and 90 days were distinct.
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Salivary cytokines levels

For IL-6 salivary, there was decrease in baseline and 90 days levels for both groups. For IL-8, it was observed that there was tendency to increase in baseline and 30 days levels and decrease between 30 and 90 days for both groups. Regarding TNF- α , the detection pattern of this cytokine was low, but it could be observed an increase in the baseline and 30 days levels, and decrease comparing 30 and 90 days in the test group. In the control group, no salivary TNF- α was detected. In the multivariate analysis taking into account data dependence between individuals (ANOVAF) and after adjusting for sex and age, it was not possible to find statistically significant differences in the concentrations over time of IL-6 ($p=0.68$) and TNF- α ($p=0.70$), but there was a significant decrease in salivary IL-8 in both groups over time ($p=0.05$) (**Figure 4**).

Discussion

There is evidence that the immune system failure observed in chronic HIV infection associated with direct HIV toxicity, microbial translocation, immune activation, and the presence of HIV reservoirs may exacerbate pre-existing conditions, including chronic oral diseases such as periodontitis^{21, 22}. There was an association between immunodeficiency (reduction in the CD4 + T lymphocyte count to below 200 cells/mm³ and increase in plasma viremia) and periodontal destruction^{23, 24}. Data from the present study provide epidemiologic information and immunological parameters of HIV infection and response to NSPT in HIV-infected individuals with CP in the post-ART era in relation to periodontal clinical parameters, salivary cytokine profile and *Candida spp* oral colonization. Age, education and alcohol use were not significant between the groups, being in agreement with the findings of Elizondo et al.²⁵ who did not verify differences in social factors such as level of education and alcohol use in cohorts of HIV-infected and non-HIV-infected patients, with mean ages similar to those of the present study. Among 22 HIV-infected patients, 14 (63.6%) were male, following the trend of growing AIDS detection rate in men in the last 10 years (BRAZIL, 2017). Seropositivity time was on average 13.5±7.2 years, which suggests a high life expectancy for these patients in Brazil, mainly due to the efficiency of the HIV infection control program in Brazil, including easy and free access to the ART²⁴.

Regarding the clinical parameters of periodontal disease, the clinical characteristics of CP in HIV-infected patients in the post-ART era were similar to those of non-HIV-infected individuals, and this is in agree with Alves et al.²⁵ and Khammissa et al.²⁶ NSPT resulted in decrease in GI and PD, as well as gain of clinical insertion in both groups, but the test group presented more loss of teeth throughout the research. Among the factors that may have influenced the progression of CP in HIV-infected individuals is the protective effect of ART. All subjects in the test group were on regular ART, which included nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors, such as zidovudine (AZT). This drug has bactericidal activity in certain gram-negative bacteria, such as *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* and *Enterobacter aerogenes*, and may have effect on the control of periodontopathogens involved in periodontal destruction^{26, 29, 30}. In addition, protease inhibitors, another class of drugs that are part

1
2
3 of ART, help to reduce the immune-regulated periodontium destruction³¹ and have an
4 inhibitory effect on the aspartic proteinases of *C. albicans*, fungus species frequent
5 infections in HIV-infected patients³².
6
7

8 Immunological parameters of HIV infection were recorded in the present study.
9
10 Although the data presented did not eliminate the possibility that ART was responsible
11 for significant increase in CD4+ T lymphocyte counts and decrease in plasma viral load,
12 our results suggest that NSPT, through oral cavity decontamination, and consequent
13 inflammation reduction may had beneficial impact on the HIV infection monitoring.
14
15 Baseline means of T CD4+ lymphocytes and viral load was 104.7 ± 57.3 and $1.444.892,2$
16 ± 423174.5 and 90 days post-NSPT was respectively 195.6 ± 155.2 and $28.380.8 \pm$
17 $103,229.3$ and this is in agreement with the findings of Noro-Filho et al.³³ and
18 Valentine et al.³⁴ The decrease in viral load may also be a result of the impact of NSPT
19 on the oral microbiota. Pereira et al.³⁵ associated detectable levels of HIV viral load
20 with high levels of periodontal pathogens such as *Tanerella forshytia*, *Prevotella*
21 *nigrescens* and *Eikenella corrodens*.
22
23
24
25
26
27
28

29 Regarding oral colonization by *Candida spp*, our results showed that individuals
30 in the test group had higher baseline CFU counts compared to the control group,
31 similar to the findings of Sangeorzan et al.³⁵, Delgado et al.³⁷ and Lourenço et al.⁵ who
32 verified higher colonization of *Candida spp* in HIV-infected individuals, especially in
33 immunodeficient patients. In addition, agree with Lourenço et al.⁵, who reported high
34 levels of *Candida spp* in HIV-infected individuals with periodontal disease. The changes
35 that occur in the oral cavity, in the presence of active periodontal disease, such as
36 periodontal pockets and increase in the gingival crevicular fluid (GCF), trigger the
37 growth of *Candida spp* filamentous species^{38, 39}. Studies have shown that *C. albicans*
38 have ability to penetrate periodontal tissues⁴⁰⁻⁴², in addition to having been suggested
39 its role in adherence to oral cells. Machado et al.⁴² reported that *C. albicans* cells
40 isolated from individuals with CP present a greater *in vitro* potential of adhesion to oral
41 epithelial cells when compared to *C. albicans* cells isolated from patients without
42 periodontal disease, suggesting higher pathogenicity of these isolated. In the present
43 study, the CFU count of *Candida spp* decreased significantly after NSPT in both groups.
44
45 Decontamination of the subgingival environment and improvement in oral hygiene in
46 these patients seems to have had positive impact on the control of oral colonization by
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 *Candida spp.* It is noteworthy that no adjuvant antifungal therapies were used during
4 the study times. In addition, we also analyzed the species of *Candida spp* present in the
5 oral rinse samples and classified as *C. albicans* and *non-albicans*. More species of *C.*
6 *albicans* were detected in the baseline in both groups agreeing with Canabarro et al.¹¹
7 who detected elevated levels of *C. albicans* in periodontal pockets of patients with CP
8 compared to individuals without periodontal disease and with Odden et al.⁴³,
9 Järvensivu et al.³⁹ and Lourenço et al.⁵ who suggest the *C. albicans* species as an
10 aggravating factor of periodontal disease.

11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

About the biomarkers, the production of proinflammatory cytokines is controlled by nuclear factor Kappa-B (NF- κ B), transcription factor that regulates the expression of several genes involved in the innate and adaptive immune response⁴⁴. FN- κ B deregulation results in the imbalance of the production of proinflammatory cytokines, as occurs in several chronic inflammatory diseases/conditions and autoimmune diseases^{45, 46}. Proinflammatory cytokines IL-6, IL-8 and TNF- α have been shown to exert various immunological functions, including regulation of the inflammatory response and cancer development⁴⁷. The present study analyzed the concentrations of IL-6, IL-8 and TNF- α salivary in both groups. There are was a decrease in salivary IL-6 concentrations after NSPT in both groups but without statistical association. Our findings agree with Valentine et al.³⁴ who reported decrease in salivary IL-6 levels after periodontal therapy in HIV-patients with CP. Salivary IL-8 concentrations decreased after NSPT over the study time in both groups. Studies have reported increased IL-8 levels in the CGF and gingival tissue of patients with CP and positive correlation between IL-8 levels and destructive activity in the periodontium has been established^{48, 49}. There are few studies that evaluate the levels of IL-8 in the saliva of HIV-infected patients with CP, which limits our discussion, however considering a pro-inflammatory cytokine involved in the local and systemic immune response to bacterial antigens, possibly its depletion cause beneficial effect in the local inflammation and consequently systemic. The detection pattern of salivary TNF- α was low, which compromised the interpretation of these findings, although, curiously, we observed higher levels in the HIV-infected group after NSPT. Spear et al.⁵⁰ detected minimal salivary concentrations of TNF- α in HIV-infected patients (<1pg / ml). It is well

1
2
3 known that TNF- α may have its expression inhibited by other cytokines such as
4 transforming growth factor-beta (TGF- β) and IL-4.
5

6 This study had some limitations, such as the difference between the test and
7 control groups in relation to sex, since the control group had a higher proportion of
8 female subjects (80%). This happened due to the losses and exclusions of males in this
9 group, related to discontinuity in treatment and return to smoking habit. Despite these
10 limitations, our results suggest that HIV-infected patients have similar pattern of
11 periodontal disease in uninfected patients, and that periodontal treatment is effective
12 in controlling periodontal disease in both groups. In addition, periodontal treatment
13 may influence the status of HIV infection, favoring increased CD4 + T lymphocyte
14 counts and reduced viral load. Finally, HIV-infected patients show greater salivary
15 expression of IL-6, IL-8 and TNF- α .
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Conclusions

It can be concluded that CP in HIV-infected individuals in the post-ART era presents pattern similar to that of non-HIV-infected individuals, and NSPT has effectiveness in disease control in both groups. In addition, NSPT showed a beneficial effect on the immunological parameters of HIV infection, such as increased CD4 + T lymphocyte counts and decreased plasma viral load, furthermore showed to be able to reduce oral colonization by *Candida spp* and the salivary levels of IL6 and IL-8 in both groups.

For Peer Review

References

1. UNAIDS. Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS. Disponível em: https://unaids.org.br/wp-content/uploads/2017/12/UNAIDSBR_FactSheet.pdf. Acessado em: fevereiro 17, 2018.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico HIV/AIDS, 2017. Available at: <http://www.aids.gov.br/es/node/59427>. Accessed: December 15, 2017.
3. Palella FJ, Jr., Delaney KM, Moorman AC, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 1998;338:853-860.
4. Mataftsi M, Skoura L, Sakellari D. HIV infection and periodontal diseases: an overview of the post-HAART era. *Oral Dis* 2011;17:13-25.
5. Lourenco AG, Ribeiro A, Nakao C, et al. Oral Candida spp carriage and periodontal diseases in HIV-infected patients in Ribeirao Preto, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2017;59:e29.
6. Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol* 1992;63:322-331.
7. Lamont RJ, Hajishengallis G. Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease. *Trends Mol Med* 2015;21:172-183.
8. Williams RC, Offenbacher S. Periodontal medicine: the emergence of a new branch of periodontology. *Periodontol* 2000 2000;23:9-12.
9. Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of Candida species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis* 2003;3:685-702.
10. Nikawa H, Jin C, Makihira S, Hamada T, Samaranayake LP. Susceptibility of Candida albicans isolates from the oral cavities of HIV-positive patients to histatin-5. *J Prosthet Dent* 2002;88:263-267.
11. Canabarro A, Valle C, Farias MR, Santos FB, Lazera M, Wanke B. Association of subgingival colonization of Candida albicans and other yeasts with severity of chronic periodontitis. *J Periodontal Res* 2013;48:428-432.
12. Barr C, Lopez MR, Rua-Dobles A. Periodontal changes by HIV serostatus in a cohort of homosexual and bisexual men. *J Clin Periodontol* 1992;19:794-801.
13. Drinkard CR, Decher L, Little JW, et al. Periodontal status of individuals in early stages of human immunodeficiency virus infection. *Community Dent Oral Epidemiol* 1991;19:281-285.
14. Goncalves LS, Ferreira SM, Silva A, Jr., Villoria GE, Costinha LH, Colombo AP. Association of T CD4 lymphocyte levels and chronic periodontitis in HIV-infected brazilian patients undergoing highly active anti-retroviral therapy: clinical results. *J Periodontol* 2005;76:915-922.
15. Robinson PG, Sheiham A, Challacombe SJ, Zakrzewska JM. The periodontal health of homosexual men with HIV infection: a controlled study. *Oral Dis* 1996;2:45-52.
16. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999;4:1-6.
17. Ainamo J, Bay I. [Periodontal indexes for and in practice]. *Tandlaegebladet* 1976;80:149-152.
18. Schenkels LC, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. *Crit Rev Oral Biol Med* 1995;6:161-175.

19. Samaranayake LP, MacFarlane TW, Lamey PJ, Ferguson MM. A comparison of oral rinse and imprint sampling techniques for the detection of yeast, coliform and *Staphylococcus aureus* carriage in the oral cavity. *J Oral Pathol* 1986;15:386-388.
20. Bass CC. An effective method of personal oral hygiene; part II. *J La State Med Soc* 1954;106:100-112.
21. Brenchley JM, Douek DC. HIV infection and the gastrointestinal immune system. *Mucosal Immunol* 2008;1:23-30.
22. Santos-Oliveira JR, Regis EG, Giacoia-Gripp CB, et al. Microbial translocation induces an intense proinflammatory response in patients with visceral leishmaniasis and HIV type 1 coinfection. *J Infect Dis* 2013;208:57-66.
23. Alpagot T, Duzgunes N, Wolff LF, Lee A. Risk factors for periodontitis in HIV patients. *J Periodontal Res* 2004;39:149-157.
24. Kinane DF, Lappin DF, Koulouri O, Buckley A. Humoral immune responses in periodontal disease may have mucosal and systemic immune features. *Clin Exp Immunol* 1999;115:534-541.
25. Elizondo JE, Rocha-Pizana MD, Trevino AC, Violant D, Alvarez MM, Rivas-Estilla AM. Potential gingival crevicular fluid and serum biomarkers by stage of HIV infection. *Cytokine* 2017;91:96-103.
26. Levi GC, Vitoria MA. Fighting against AIDS: the Brazilian experience. *AIDS* 2002;16:2373-2383.
27. Alves M, Mulligan R, Passaro D, et al. Longitudinal evaluation of loss of attachment in HIV-infected women compared to HIV-uninfected women. *J Periodontol* 2006;77:773-779.
28. Khammissa R, Feller L, Altini M, Fatti P, Lemmer J. A Comparison of Chronic Periodontitis in HIV-Seropositive Subjects and the General Population in the Ga-Rankuwa Area, South Africa. *AIDS Res Treat* 2012;2012:620962.
29. Riley C, London JP, Burmeister JA. Periodontal health in 200 HIV-positive patients. *J Oral Pathol Med* 1992;21:124-127.
30. Elwell LP, Ferone R, Freeman GA, et al. Antibacterial activity and mechanism of action of 3'-azido-3'-deoxythymidine (BW A509U). *Antimicrob Agents Chemother* 1987;31:274-280.
31. Patton LL, McKaig R, Strauss R, Rogers D, Eron JJ, Jr. Changing prevalence of oral manifestations of human immuno-deficiency virus in the era of protease inhibitor therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;89:299-304.
32. Munro CA, Hube B. Anti-fungal therapy at the HAART of viral therapy. *Trends Microbiol* 2002;10:173-177.
33. Noro Filho GA, Salgado DM, Casarin RC, Casati MZ, Costa C, Giovani EM. Anti-infective periodontal therapy promoting improvement in systemic markers of HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2013;29:1040-1044.
34. Valentine J, Saladyanant T, Ramsey K, et al. Impact of periodontal intervention on local inflammation, periodontitis, and HIV outcomes. *Oral Dis* 2016;22 Suppl 1:87-97.
35. Pereira VT, Pavan P, Souza RC, et al. The association between detectable plasmatic human immunodeficiency virus (HIV) viral load and different subgingival microorganisms in Brazilian adults with HIV: a multilevel analysis. *J Periodontol* 2014;85:697-705.
36. Sangeorzan JA, Bradley SF, He X, et al. Epidemiology of oral candidiasis in HIV-infected patients: colonization, infection, treatment, and emergence of fluconazole resistance. *Am J Med* 1994;97:339-346.
37. Delgado AC, de Jesus Pedro R, Aoki FH, et al. Clinical and microbiological assessment of patients with a long-term diagnosis of human immunodeficiency virus infection and *Candida* oral colonization. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:364-371.

- 1
2
3 38. Reynaud AH, Nygaard-Ostby B, Boygard GK, Eribe ER, Olsen I, Gjermo P. Yeasts in
4 periodontal pockets. *J Clin Periodontol* 2001;28:860-864.
5 39. Jarvensivu A, Hietanen J, Rautemaa R, Sorsa T, Richardson M. Candida yeasts in chronic
6 periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms in vivo. *Oral Dis* 2004;10:106-
7 112.
8 40. Listgarten MA, Lai CH, Young V. Microbial composition and pattern of antibiotic
9 resistance in subgingival microbial samples from patients with refractory periodontitis.
10 *J Periodontol* 1993;64:155-161.
11 41. Sardi JC, Duque C, Mariano FS, Peixoto IT, Hofling JF, Goncalves RB. Candida spp. in
12 periodontal disease: a brief review. *J Oral Sci* 2010;52:177-185.
13 42. Machado AG, Komiyama EY, Santos SS, Jorge AO, Brighenti FL, Koga-Ito CY. In vitro
14 adherence of Candida albicans isolated from patients with chronic periodontitis. *J Appl*
15 *Oral Sci* 2011;19:384-387.
16 43. Odden K, Schenck K, Koppang H, Hurlen B. Candidal infection of the gingiva in HIV-
17 infected persons. *J Oral Pathol Med* 1994;23:178-183.
18 44. Lorusso G, Ruegg C. The tumor microenvironment and its contribution to tumor
19 evolution toward metastasis. *Histochem Cell Biol* 2008;130:1091-1103.
20 45. Feghali CA, Wright TM. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci*
21 1997;2:d12-26.
22 46. Allavena P, Garlanda C, Borrello MG, Sica A, Mantovani A. Pathways connecting
23 inflammation and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2008;18:3-10.
24 47. Brailo V, Vucicevic-Boras V, Lukac J, et al. Salivary and serum interleukin 1 beta,
25 interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in patients with leukoplakia and oral
26 cancer. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2012;17:e10-15.
27 48. Tsai CC, Ho YP, Chen CC. Levels of interleukin-1 beta and interleukin-8 in gingival
28 crevicular fluids in adult periodontitis. *J Periodontol* 1995;66:852-859.
29 49. Giannopoulou C, Kamma JJ, Mombelli A. Effect of inflammation, smoking and stress on
30 gingival crevicular fluid cytokine level. *J Clin Periodontol* 2003;30:145-153.
31 50. Spear GT, Alves ME, Cohen MH, Bremer J, Landay AL. Relationship of HIV RNA and
32 cytokines in saliva from HIV-infected individuals. *FEMS Immunol Med Microbiol*
33 2005;45:129-136.
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

Figure legends

Figure 1. Flowchart showing the study design.

Figure 2. Periodontal clinical parameters: (A) IG (boxplot) and Least-square means with 95% confidence limits for (B) PD, (C) CAL and (D) number of teeth for test and control groups at different times of the study.

Figure 3. *Candida spp* count for test and control groups at different times of the study.

Figure 4. Medians of salivary levels of (A) IL-6, (B) IL-8 and (C) TNF- α for test and control groups at different times of the study.

For Peer Review

Table 1. Socio-demographic features of test and control groups. Data presented as absolute number (n) and percentag (%), except when indicated.

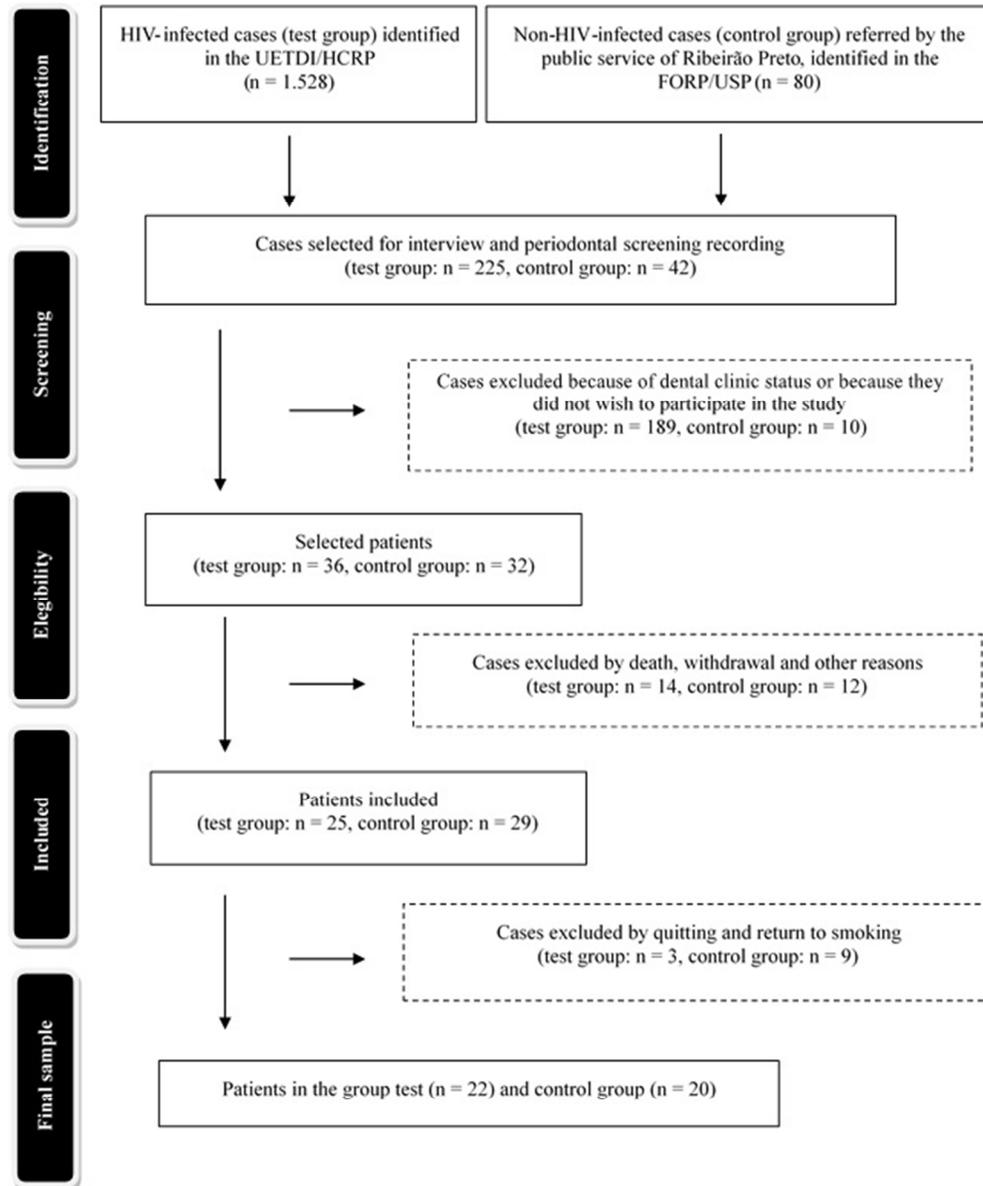
Variable	Test group (n=22)	Control group (n=20)	p value
Sex (%)			
Male	14 (63,6)	04 (20)	0,0043
Female	08 (36,4)	16 (80)	
Mean age (SD)	44,8 (5,8)	47,8 (12,8)	0,3398
Ethnicity (%)			
White	15 (68,2)	19 (95)	0,0471
Non-white	07 (31,2)	01 (05)	
Education (%)			
Incomplete primary education	09 (40,9)	07 (35)	0,4081
Complete primary education	04 (18,2)	03 (15)	
Incomplete high school	05 (22,7)	02 (10)	
Complete high school	04 (18,2)	08 (40)	
Marital status (%)			
Married	05 (22,7)	16 (80)	0,0001
With partner	02 (9,1)	00 (00)	
Single	13 (59,1)	03 (15)	
Divorced/widower	02 (9,1)	01 (05)	
Alcohol (%)			
Yes	01 (2,4)	00 (00)	0,9999
No	21 (95,4)	20 (100)	
Opportunistic infection (%)			
Yes	18 (81,8)	03 (15)	0,0001
No	04 (18,2)	17 (85)	

SD = standard deviation; p value for chi-square test or Fisher's exact teste or t-test (age comparasion).

Table 2. *Epidemiological characteristics and immunological parameters of the test group.*

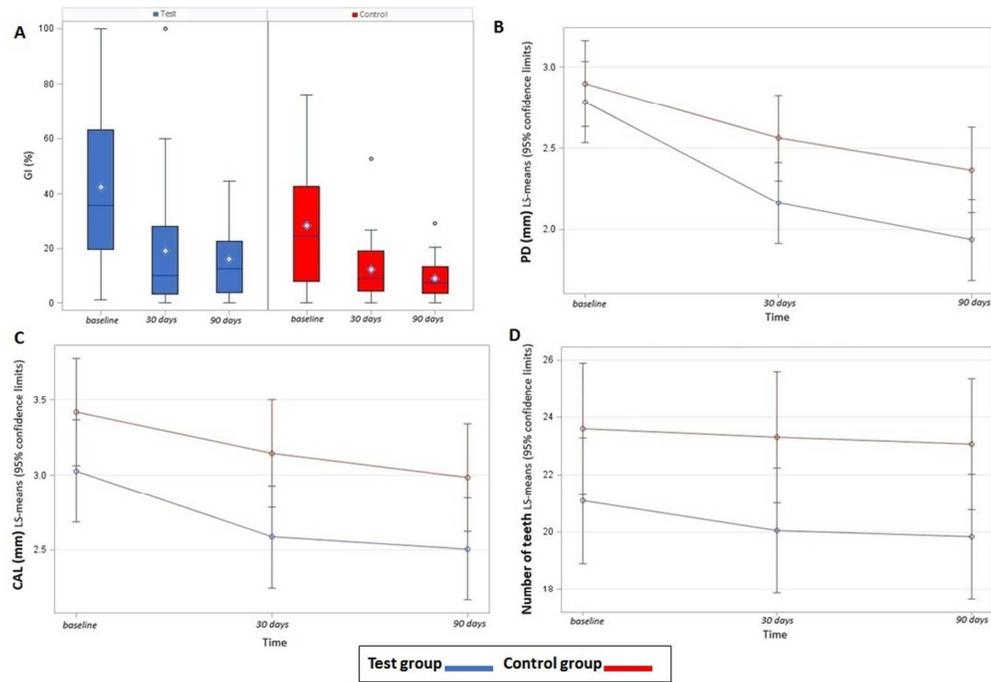
Variables	Test group (n=22)				p value
	Mean ± SD	Medium	Q1-Q3	Minimum-maximum	
Time of seropositivity (years)	13,5±7,2	15,0	7-17	2–29	NA
Treatment time (years)	10,7±8,5	10,5	3-15	0,25–29	NA
TCD4+ lymphocytes					
Baseline	104,7±57,3	105,0	66–140	11–206	
30 days	165,7±110,4	178,0	67–228	15–359	0,0120
90 days	195,6±155,2	122,0	93–273	29–622	
Viral load					
Baseline	1.444.892,27±423174,5	40	40–106,9	40–1.941.107	
30 days	19.547,4±66.181,4	40	40–249,0	40–282.443	0,2984
90 days	28.380,8±103.229,3	40	40–239,0	40–461.382	

SD = standard deviation; p value for Friedman's test for comparison of values throughout the study; NA = Not applicable.



Flowchart showing the study design.

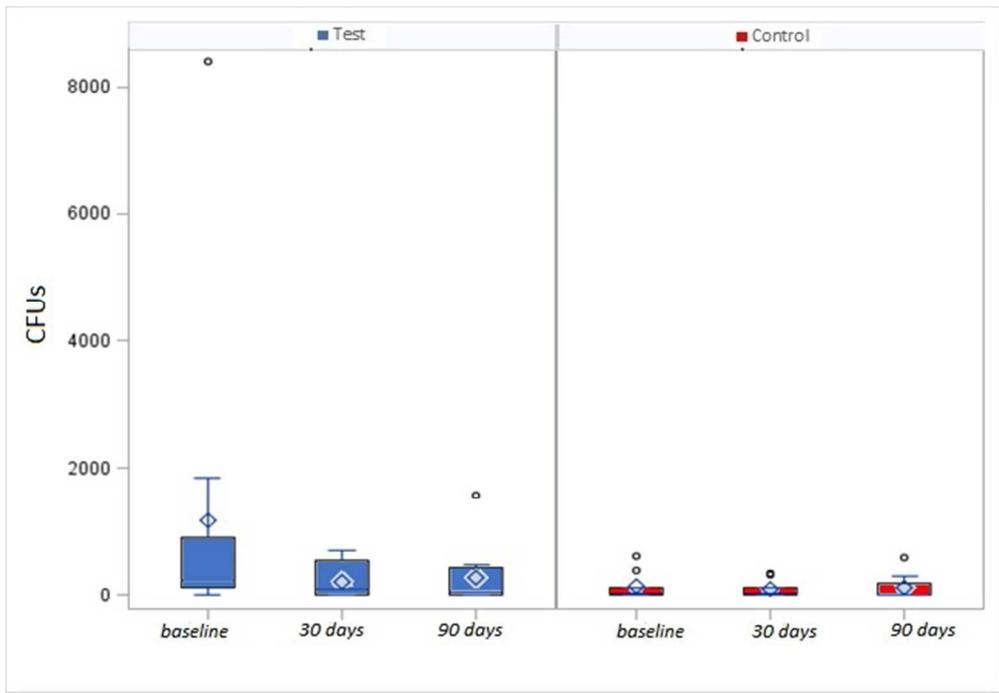
172x206mm (96 x 96 DPI)



Periodontal clinical parameters: (A) IG (boxplot) and Least-square means with 95% confidence limits for (B) PD, (C) CAL and (D) number of teeth for test and control groups at different times of the study.

288x197mm (96 x 96 DPI)

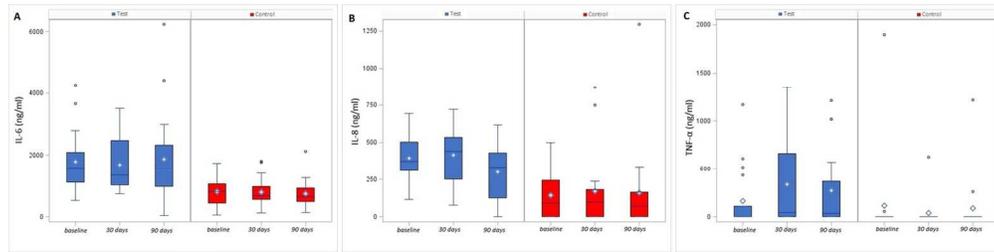
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Candida spp count for test and control groups at different times of the study.

171x118mm (96 x 96 DPI)

review



Medians of salivary levels of (A) IL-6, (B) IL-8 and (C) TNF- α for test and control groups at different times of the study.

439x109mm (96 x 96 DPI)

For Peer Review