

TÁBATA LARISSA SANTOS PÓLVORA

Influência do tratamento periodontal não-cirúrgico na contagem oral de *Candida spp*, e nos níveis salivares de lactoferrina e histatina, em pacientes infectados pelo HIV-1 apresentando periodontite crônica

São Paulo

2018

TÁBATA LARISSA SANTOS PÓLVORA

Influência do tratamento periodontal não-cirúrgico na contagem oral de *Candida spp*, e nos níveis salivares de lactoferrina e histatina, em pacientes infectados pelo HIV-1 apresentando periodontite crônica

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Diagnóstico Bucal) para obter o título de Mestre em Ciências.

Orientador: Profa. Dra. Ana Carolina Fragoso Motta

São Paulo

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.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Pólvora, Tábata Larissa Santos.

Influência do tratamento periodontal não-cirúrgico na contagem oral de *Candida* spp, e nos níveis salivares de lactoferrina e histatina, em pacientes infectados pelo HIV-1 apresentando periodontite crônica / Tábata Larissa Santos Pólvora ; orientador Ana Carolina Fragoso Motta. -- São Paulo, 2018.

91 p. : fig., tab. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Diagnóstico Bucal -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. HIV-1. 2. Periodontite crônica. 3. Saliva. 4. Peptídeos. I. Motta, Ana Carolina Fragoso. II. Título.

Polvora TLS. Influência do tratamento periodontal não-cirúrgico na contagem oral de *Candida spp*, e nos níveis salivares de lactoferrina e histatina, em pacientes infectados pelo HIV-1 apresentando periodontite crônica. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 25 / 05 /2018

Banca Examinadora

Prof. Dr. Alan Grupioni Lourenço

Instituição: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP Julgamento: Aprovada

Prof. Dr. Noberto Nobuo Sugaya

Instituição: Faculdade de Odontologia de São Paulo-USP Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Mônica Andrade Lotufo

Instituição: Universidade Nove de Julho Julgamento: Aprovada

Dedico...

À Deus, pois se eu cheguei até aqui foi através de ti. Foi o meu sustento e minha força nos momentos mais fracos, mesmo sem muitas vezes eu merecer nunca me abandonou. Muito obrigada Senhor por me amar e cuidar de mim, que a cruz sagrada seja a minha luz por todos meus caminhos. Até quando eu viver, vou te honrar. Posso perder tudo, mas nunca a minha fé em ti.

À Nossa Senhora, por me amar como filha, cuidar de mim, pude sentir sua presença em todos os momentos dessa jornada, o terço foi meu alimento e minha força para seguir em frente e não desistir diante das dificuldades. Obrigada minha mãe.

À minha mãe Carmem, minha grande guerreira e amiga. Por todos momentos difíceis que passamos, conseguimos mais uma conquista. Mãe, você é meu alicerce. Enquanto houver você do outro lado, eu estarei aqui, de pé, forte, pois eu sei que independente do que aconteça eu sempre vou ter o seu abraço e seu amor. Obrigada por seu meu porto seguro, minha paz, minha vida. Essa vitória é sua, minha rainha e minha inspiração.

Ao meu irmão Raony, por ser meu anjo enviado por Deus, grande amigo e parceiro da vida. Agradeço pelo incentivo constante e por sempre acreditar no meu potencial.

À minha mestre Profa. Fabiana de Freitas Bombarda Nunes, por ter sido uma grande incentivadora dos meus sonhos acadêmicos. Eu agradeço seu carinho, amizade, profissionalismo e por ter semeado em mim o amor pela estomatologia.

Aos participantes do estudo, que diante da fragilidade em conviver com a infecção por HIV e sofrer todo o preconceito, que ainda existe em torno da doença, transmitiram-me grandes lições de vida, mostraram-me o verdadeiro valor da vida, e depositaram toda a confiança em nossa equipe de trabalho na esperança de uma possível melhoria na qualidade de vida. Sem o “sim” de vocês não seria possível a concretização deste estudo.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Ana Carolina Fragoso Motta, por ter me acolhido como orientada, por ter me incentivado a não desistir do meu ingresso no mestrado, quando todas as possibilidades pareciam esgotadas. Pelo incentivo e confiança depositados em todas as atividades que me propus. Por me inspirar a ser uma profissional dedicada, prudente, e sobretudo sensível para com os alunos e pacientes. Trabalhar contigo durante o mestrado me fez evoluir bastante como dentista e ser humano! Não existem palavras para expressar a minha gratidão!

À Profa. Dra. Marilena Chinali Komesu, por ter me aberto a primeira porta da USP, proporcionando o meu estágio no DAPE, sem mesmo me conhecer, investindo grandemente na minha carreira acadêmica. Pelos conhecimentos compartilhados durante todo este período em que ficamos juntas. Além das inúmeras oportunidades que me proporcionou. Muito obrigada é muito pouco para manifestar minha gratidão!

Ao Prof. Dr. Alan Grupioni Lourenço, por toda a paciência, amizade e por confiar parte do seu trabalho, a mim. Agradeço por ser grande colaborador para a minha vida profissional. Desejo todo o sucesso ao longo da sua vida como professor.

A Profa. PhD. Maria da Conceição Pereira Saraiva, por toda ajuda fundamental e dedicação de tantas horas para a conclusão do meu trabalho na etapa final. Por ter tido a oportunidade de conhecer um ser humano tão bom e por me fazer refletir sobre algumas decisões da vida. Agradeço imensamente por essa amizade e carinho.

À Faculdade de Odontologia de São Paulo (FOUSP) e a Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP), por me proporcionar realizar o sonho de cursar uma pós-graduação de excelência na melhor instituição do país. Agradeço a Profa. Dra. Silvia Vanessa Lourenço, coordenadora do Programa em Diagnóstico Bucal e a todos que fazem parte desta escola.

À FAESA (Faculdades Integradas Espírito-Santenses), pela minha formação e por me encher de orgulho em ter construído toda minha base profissional com

excelência. A todos os mestres que me inspiraram em estar aqui, minha eterna admiração pela competência e profissionalismo de vocês: Prof. Antônio de Melo Cabral, Profa. Liliane Scheidegger da Silva Zanetti, Prof. Dilson Alves, Prof. Francisco Bento, Profa. Zilda Fagundes, Prof. Moyses Francisco Vieira Netto e Prof. Hamilton Xavier.

À Unidade Especial de Terapia de Doenças Infecciosas do Hospital das Clínicas da FMRP-USP e toda sua equipe, por ter colaborado por esse trabalho.

Ao colega Átila Vinícius Vitor Nobre, pela parceria no desenvolvimento da pesquisa em finalizarmos esse trabalho e etapa juntos. Ufa! Conseguimos...

Às secretárias do Departamento de Estomatologia, Regiane (FORP), Ninoca e Cidinha da (FOUSP), pela atenção e agilidade em todos os momentos.

Aos meus amigos e parceiros de laboratório, Gilberto e Renata Klemp, por terem me permitindo ótimos períodos de convivência, por toda ajuda nas análises do meu trabalho. Meu eterno agradecimento e por essa parceria de sucesso, entre nós.

À grande amiga Cristina Orlandi, por ter cuidado da minha mãe, por suas orações e torcida. Agradeço também a todas intercessoras das 1.000 Ave-Marias.

Às Dra. Selma Vilela e a Rianne Vilela, por terem me dado a primeira oportunidade de trabalho como cirurgiã-dentista, acreditaram no meu potencial e me permitiram exercer sempre a odontologia com amor. Com vocês pude evoluir como pessoa e profissional. Vocês praticam a odontologia que eu acredito, agradeço por fazerem parte da minha vida.

Aos amigos que Ribeirão Preto me presenteou, **Jô Santos** por ter sido meu colo de mãe, na ausência da minha... As minhas amigas e parceiras, **Cris, Lucimélia, Tati e Elaine**... Vocês me fazem muito feliz, conviver com vocês é um grande presente para mim. **Thaisita**, minha melhor companhia. Obrigado pelo suporte desde os primeiros momentos que estive nesta cidade. Sem a existência de vocês, minha vida aqui não seria a mesma.

"Habitue-se a ouvir a voz do seu coração. É através dele que Deus fala conosco e nos dá a força que necessitamos para seguirmos em frente, vencendo os obstáculos que surgem na nossa estrada".

Irmã Dulce

RESUMO

Pólvora TLS. Influência do tratamento periodontal não-cirúrgico na contagem oral de *Candida spp*, e nos níveis salivares de lactoferrina e histatina, em pacientes infectados pelo HIV-1 apresentando periodontite crônica [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Corrigida.

Estudos atuais revelam que, mesmo na era da terapia antirretroviral (TARV), a infecção pelo HIV-1 é associada com quadros graves e frequentemente refratários de periodontite crônica (PC), despertando para a possibilidade da existência de outros fatores associados ao desenvolvimento da PC nesses pacientes. Acredita-se que fatores relacionados à população microbiana, incluindo as infecções por *Candida spp*, e a expressão de peptídeos microbianos possam estar envolvidos na patogênese da PC em pacientes infectados pelo HIV-1. O objetivo desse estudo foi determinar a influência do tratamento periodontal não-cirúrgico, na contagem oral de *Candida spp*, e nos níveis salivares de lactoferrina (Lf) e histatina, por meio de um estudo quase-experimental. Pacientes infectados (Grupo 1) e não infectados pelo HIV-1 (Grupo 2 – controle), todos com PC, foram submetidos à terapia periodontal não cirúrgica. Os pacientes do grupo 1 apresentaram contagem de linfócitos T CD4+ < 200cel/mm³, e estavam em TARV regular. Foi avaliada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Candida spp* por meio de enxaguado bucal e níveis salivares de Lf e histatina antes (Tempo 0-1) e após a terapia periodontal (Tempo 2 e 3; 30 e 90 dias após o tratamento, respectivamente). Pacientes do grupo 1 apresentaram contagem de UFC superiores à verificada nos pacientes do grupo 2 (p=0, 268; ANOVA). Houve tendência a redução de UFC após o tratamento periodontal em ambos os grupos, mas sem diferenças estatisticamente significantes. Os níveis de Lf foram semelhantes entre os grupos, e reduziram 30 dias após o tratamento periodontal (p=0,0111; Mann Whitney). Os níveis salivares de histatina ao tempo 0 foram mais elevados no grupo 1 quando comparado ao grupo 2 (p= 0,6481; Tukey-kramer), mas tiveram comportamento distinto após o tratamento periodontal: foram mais elevados no grupo 1 e reduziram no grupo 2. Estes resultados sugerem a associação entre a presença de *Candida spp* e a PC, e também a importância da manutenção da higiene oral na prevenção da candidíase. Além disso, Lf salivar pode

ser um marcador da PC, tanto em pacientes não-infectados, quanto infectados pelo HIV.

Palavras-chave: HIV-1, periodontite crônica, *Candida spp*, saliva, peptídeos antimicrobianos.

ABSTRACT

Pólvora TLS. Influence of non-surgical periodontal treatment on the oral *Candida spp* count, and salivary levels of lactoferrin and histatin, in HIV-1-infected patients with chronic periodontitis [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Corrigida.

Current studies reveal that, even in the era of antiretroviral therapy (ART), HIV-1 infection is associated with severe and frequently refractory chronic periodontitis (CP), which leads to the possibility of other factors associated with the development of CP in these patients. It is believed that factors related to the microbial population, including *Candida spp* infections, and the expression of microbial peptides may be involved in the pathogenesis of CP in patients infected with HIV-1. The aim of this study was to determine the influence of non-surgical periodontal treatment on the oral count of *Candida spp* and on the salivary levels of lactoferrin (Lf) and histatin, by means of a quasi-experimental study. Patients infected (Group 1) and non-HIV-1 infected (Group 2 - control), all with CP, underwent non-surgical periodontal therapy. Patients in group 1 had a CD4 + T-cell count $<200\text{cel} / \text{mm}^3$, and were on regular ART. The counts of colony forming units (CFU) of *Candida spp* were evaluated by oral rinsing and salivary levels of Lf and histatin before (Time 0-1) and after periodontal therapy (Time 2 and 3, 30 and 90 days after the treatment, respectively). Patients in group 1 had a higher CFU count than in patients in group 2 ($p = 0.268$; ANOVA). There was a tendency to reduce CFU after periodontal treatment in both groups, but without statistically significant differences. Lf levels were similar between groups, and reduced 30 days after periodontal treatment ($p = 0.0111$; Mann Whitney). Salivary levels of histatin at time 0 were higher in group 1 when compared to group 2 ($p = 0.6481$; Tukey-Kramer), but had distinct behavior after periodontal treatment: they were higher in group 1 and reduced in group 2. These results suggest the association between the presence of *Candida spp* and CP, and also the importance of maintaining oral hygiene in the prevention of candidiasis. In addition, Lf salivary can be a marker of CP in both uninfected and HIV infected patients.

Keywords: HIV-1, chronic periodontitis, *Candida spp*, saliva, antimicrobial peptides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Representação esquemática de peptídeos antimicrobianos salivares envolvidos na patogênese da infecção pelo HIV	33
Figura 4.1 - Critérios de inclusão e exclusão empregados no estudo	38
Figura 4.2 - Fluxograma etapas do estudo.....	40
Figura 4.3 - Colonização por <i>Candida</i> em Ágar Sabouraud-dextrose	44
Figura 4.4 - Colonização por <i>Candida</i> em meio “CHROMagar™ <i>Candida</i> ”	44
Figura 4.5 - Microplaca para dosagem de lactoferrina pela técnica ELISA direto ...	45
Figura 5.1 - Fluxograma demonstrando o processo de identificação e seleção dos pacientes incluídos no estudo	50
Figura 5.2 - Mediana e 95% de intervalo de confiança. Resposta do tratamento periodontal nos diferentes tempos do estudo, a profundidade de sondagem (a) a interação entre as etapas de tratamento está borderline ($p=0,0793$) e o tempo foi significativo, houve melhora no grupo controle no nível clínico de inserção (b), porém estatisticamente não significativo e não teve interação com o tempo de tratamento ($p=0,6523$) e índice de sangramento (c) o comportamento de variação de sangramento ao longo do tempo não foi diferente, assim como os grupos não foram estatisticamente diferentes ($p = 0.0873$) sendo apenas o tempo relevante no declínio de sangramento para os dois grupos ($p < 0.001$)..	55
Figura 5.3 - Mediana e 95% de intervalo de confiança. Comportamento da lactoferrina (a) e histatina (b) ao longo do tempo, nos dois grupos.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Perfil clínico e demográfico dos pacientes infectados e não infectados por HIV	52
Tabela 5.2 - Parâmetros imunológicos da infecção pelo HIV	53
Tabela 5.3 - Parâmetros clínicos periodontais	57
Tabela 5.4 - Contagem oral de UFC (desvio padrão) de <i>Candida spp</i> e frequência de espécies (<i>C. albicans</i> ou <i>C. não-albicans</i>) nos pacientes dos grupos 1 e 2, e nos diferentes tempos do estudo	61
Tabela 5.5 - Contagem de lactoferrina e histatina nos grupos 1 e 2 nos diferentes tempos do estudo.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
µl	Microlitro
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ATP	Adenosina Trifosfato
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
Ca	Cálcio
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
<i>Candida spp</i>	Espécies do gênero <i>Candida</i>
Cél	Células
DP	Desvio Padrão
EP	Erro Padrão
Fe	Ferro
FORP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
g	Gravidade
H	Histatina
HC-FMRP/USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana Subtipo 1
IL-18	Interleucina 18
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IS	Índice de sangramento
ISG	Índice de Sangramento Gengival
Lf	Lactoferrina
M	Molar
Mg	Magnésio
Min	Minutos
ml	Milésima parte de um litro
mm	Milímetro

mm ³	Milímetro cúbico
NIC	Nível clínico de inserção
Nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC	Periodontite Crônica
PCI	Perda Clínica de Inserção
pg	Picograma
pH	Potencial Hidrogeniônico
PMN	Polimorfonucleares
PS	Profundidade de Sondagem
Sinan	Sistema Nacional de Informação de Agravos de Notificação
TARV	Terapia Antiretroviral
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral-Alfa
™	Trademark
UBSs	Unidades Básicas de Saúde
UETDI	Unidade Especial de Tratamento de Doenças Infecciosas
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DA LITERATURA	27
2.1	Aspectos clínicos da periodontite crônica associada à infecção por HIV	27
2.2	Microbiota oral na doença periodontal de infectados pelo HIV-1	29
2.3	Biomarcadores salivares na periodontite crônica associada à infecção pelo HIV-1	31
3	PROPOSIÇÃO	35
4	PACIENTES E MÉTODOS.....	37
4.1	Pacientes.....	37
4.2	Delineamento de estudo	39
4.3	Coleta dos dados clínicos	41
4.4	Coleta das amostras.....	42
4.5	Análises laboratoriais	43
4.6	Análise estatística	46
5	RESULTADOS	49
5.1	Pacientes.....	49
5.2	Parâmetros clínicos periodontais	54
5.3	Contagem oral de <i>Candida spp</i>	59
5.4	Comportamento da lactoferrina e histatina na saliva.....	63
6	DISCUSSÃO	65
7	CONCLUSÃO.....	69
	REFERÊNCIAS	71
	ANEXO	79

1 INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV-1), causa da aids, é uma doença infectocontagiosa, que continua a ser um grave problema de saúde pública mundial, especialmente no leste e sudeste da África (UNAIDS, 2017). No Brasil, 882.810 casos de aids foram registrados desde o começo da epidemia até Junho de 2017 (Brasil, 2017). Apesar das altas taxas de mortalidade devido a causas relacionadas à infecção pelo HIV-1 (1.1 milhões de mortes mundialmente), o controle da doença com o advento da terapia antiretroviral (TARV) tem levado ao aumento da expectativa de vida das pessoas infectadas pelo HIV-1 (36.7 milhões), de forma que nesta população, a preocupação consiste não só nas comorbidades relacionadas ao HIV-1, mas também àquelas não relacionadas ao HIV-1

Existe grande interesse no estudo das manifestações crônicas associadas à infecção pelo HIV-1. No contexto da TARV, doenças inflamatórias crônicas orais, especialmente doenças periodontais, ganham destaque quando comparadas às clássicas manifestações orais da imunossupressão, muito bem descritas na era pré-TARV (Classification and diagnostic criteria for oral lesions in HIV infection, 1993; Kinane et al., 1999; Alpagort et al., 2004). Sabe-se que a imunossupressão em pacientes infectados pelo HIV-1 favorece o desequilíbrio entre a agressão microbiana e a resposta imune do hospedeiro, que, por sua vez, pode potencializar a destruição dos tecidos periodontais; de fato, uma correlação positiva tem sido demonstrada entre a perda de tecido de inserção e a redução na contagem de linfócitos T CD4+ T cells (Barr et al., 1992; Nery et al., 1994; Saunus et al., 2008; Berberi; Norujeint, 2015). Assim, o comprometimento da resposta imune em indivíduos infectados pelo HIV-1, em combinação com outros fatores inerentes ao hospedeiro oferece um risco adicional para a destruição periodontal (Barr et al., 1992; Glick et al., 1994; Salvi et al., 1997; Vernon et al., 2009; Mataftsi et al., 2011).

Além das infecções bacterianas, as infecções fúngicas orais se destacam no contexto da infecção pelo HIV-1 por serem de ocorrência frequente em quadros de imunossupressão (Alpagort et al., 2008). A maioria das infecções fúngicas orais são causadas por fungos do gênero *Candida spp*, que possuem relação comensal com a cavidade oral, mas que assumem características de patogenicidade em estados de

imunossupressão. Além da *C. albicans*, outras espécies são comumente encontradas, dentre elas, a *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. dubliniensis* (Eggimann et al., 2003).

Acredita-se que espécies do gênero *Candida spp* possuem fatores de patogênicos que possibilitam o agravamento da doença periodontal, como por exemplo, a capacidade de invadir o epitélio do sulco, o potencial de inibição da função dos polimorfonucleares, lise dos monócitos, presença de endotoxinas e produção de enzimas (Nery et al., 1994). A produção de fosfolipase, juntamente com a proteinase, parece exercer papel importante na invasão celular do hospedeiro, pois são enzimas hidrolíticas que destroem, alteram ou danificam a integridade da membrana celular, levando a disfunção ou interrupção das atividades celulares (Eggimann et al., 2003).

Além dos aspectos microbiológicos, o estudo de biomarcadores que possam estar envolvidos na periodontite crônica em pacientes infectados pelo HIV-1, incluindo quimiocinas, citocinas e peptídeos antimicrobianos, pode contribuir para o entendimento da patogênese e progressão da doença periodontal, assim como para a busca de alvos terapêuticos (Barr et al., 1992; Classification and diagnostic criteria for oral lesions in HIV infection, 1993). Muitos destes marcadores estão presentes na saliva, fluido crevicular gengival e tecidos orais, e apresentam importantes propriedades quimiotáticas, inflamatórias e angiogênicas (Baqui et al., 2000). Além disso, eles são responsáveis por ampla gama de propriedades anti-HIV-1, incluindo síntese de proteína antiviral, degradação do RNA e inibição da replicação viral, além de atuarem na resposta imune antigênica, causando reações da fase aguda da inflamação. No entanto, a deficiência na sua secreção e atividade pode aumentar a replicação do HIV-1 na cavidade oral (de Lima et al., 2016; Miller et al., 2010).

Conhecer o perfil clínico, microbiológico e molecular da periodontite crônica em indivíduos infectados pelo HIV-1 pode contribuir para a prevenção da destruição adicional dos tecidos periodontais, minimizar as reações inflamatórias locais e/ou sistêmicas, reduzir a manutenção do vírus em latência, além de oferecer novas possibilidades terapêuticas para a doença periodontal. Dentro deste contexto, este trabalho se propõe a estudar aspectos sobre a inter-relação entre a infecção pelo HIV-1 e a periodontite crônica, englobando três tópicos: aspectos clínicos da

periodontite crônica, participação de espécies do gênero *Candida spp* na doença periodontal e participação de biomarcadores orais na periodontite crônica associada à infecção pelo HIV-1, por meio de estudo quase-experimental avaliando o impacto do tratamento periodontal não-cirúrgico sobre os níveis salivares de lactoferrina e histatina, e sobre a contagem oral de *Candida spp*, em pacientes infectados pelo HIV-1 apresentando periodontite crônica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos clínicos da periodontite crônica associada à infecção por HIV

A história natural da periodontite consiste no seu início durante ou logo após a puberdade a partir do acúmulo de biofilme bacteriano, que é responsável pelo recrutamento de neutrófilos e linfócitos para o epitélio juncional e tecido conjuntivo da região sulco-gengival (Lindhe et al., 2005). Com a continuidade da agressão tecidual pelos microrganismos do biofilme, há a intensificação do processo inflamatório estabelecendo a gengivite propriamente dita. Posteriormente ao estabelecimento da gengivite, o epitélio juncional pode migrar em direção apical associando-se à propagação do infiltrado inflamatório e perda progressiva de tecido ósseo e da inserção alveolar. Estes eventos finais caracterizam a periodontite crônica (Lindhe et al., 2005).

O fator etiológico primário da periodontite é o biofilme bacteriano, entretanto outros fatores podem contribuir para a patogênese da doença, incluindo fatores inerentes ao hospedeiro, como o uso de medicamentos, tabagismo, fatores genéticos, estresse e doenças que imunossuprimem o indivíduo (Lindhe et al., 2005). Está bem reconhecido que o início da doença periodontal depende da interação entre os microrganismos (principalmente bactérias) do biofilme dental e a resposta imune do hospedeiro (Kinane et al., 2017). Enquanto a bactéria coloniza e invade os tecidos periodontais, o hospedeiro se esforça para manter o equilíbrio entre estes patógenos e a microbiota comensal (Alpagot et al., 2004). O desequilíbrio na população microbiana (disbiose) resulta em danos aos tecidos periodontais (Kinane et al., 1999; Van Dyke; Serhan, 2003; Ji et al., 2015).

A infecção pelo HIV-1 atua como um fator modificador na doença periodontal, e é frequentemente associada à ocorrência de doenças agudas (gengivite e periodontite necrosante e eritema gengival linear) e exacerbação de periodontite crônica pré-existente (Winkler; Robertson, 1992; Van Dyke; Serhan, 2003). A diminuição na contagem de linfócitos T CD4+ resulta na prolongada ativação neutrofílica e aumentada carga viral plasmática, que por sua vez causa ativação

imune local e sistêmica e contribui para o surgimento de doença periodontal mais grave e refratária aos tratamentos convencionais (Kinane et al., 1999; Alpagot et al., 2004).

Em relação aos parâmetros clínicos periodontais, adultos infectados pelo HIV-1 com baixas contagens de linfócitos TCD4+ apresentam maior risco, duas vezes mais, para perda de inserção clínica e ruptura tecidual que controles não-infectados (Barr et al., 1992). Aliado a outros fatores como idade, tabagismo, doença periodontal pré-existente, pobre higiene oral e dieta inadequada, a imunossupressão aumenta o risco para o início da periodontite (Glick et al., 1994; Vernon et al., 2009; Mataftsi et al., 2011; Berberi; Noujeim, 2015). Adicionalmente, Alpagot et al. (2004) encontraram associação entre os níveis de elastase e β -glucuronidas neutrofílica e os parâmetros clínicos periodontais (profundidade de sondagem e nível clínico de inserção) em indivíduos infectados pelo HIV-1, possivelmente devido ao aumento do número de leucócitos polimorfonucleares (PMN), os quais produzem essas enzimas. A elastase é uma das principais enzimas dos grânulos azurófilos dos neutrófilos humanos, e sua liberação nos tecidos gengivais inflamados, contribuem para o dano tecidual na doença periodontal, pela degradação de várias proteínas, incluindo elastina, colágeno e fibrinogênio (Armitage et al., 1994; Robinson, 2002). A β -glucuronidase é uma enzima envolvida na degradação de glicosaminoglicanos. Níveis elevados de β -glucuronidase no fluido crevicular gengival podem ser resultado da interação local de leucócitos polimorfonucleares com endotoxinas e outros fatores liberados por microorganismos subgengivais, e estão associados significativamente à inflamação, profundidade de bolsa periodontal e perda óssea alveolar (Lamster et al., 1994; Alpagot et al., 2008).

Apesar da associação entre a gravidade da doença periodontal e a infecção pelo HIV-1 ser bem estabelecida, alguns fatores que afetam a progressão da doença periodontal podem comprometer a interpretação destes resultados, como por exemplo, o uso de antibióticos e anti-inflamatórios, e a não exclusão de doenças/condições consideradas modificadoras da doença periodontal, como diabetes mellitus, gravidez, tabagismo e fatores genéticos (Drinkard et al., 1991; Riley et al., 1992; Robinson et al., 1996; McKaig et al., 1998; Gonçalves et al., 2005). Adicionalmente, as diferentes formas de caracterização da doença periodontal e as

diversas metodologias usadas para registrar os parâmetros clínicos periodontais também parecem influenciar os resultados destes trabalhos (Vernon et al., 2009).

2.2 Microbiota oral na doença periodontal de infectados pelo HIV-1

O imunocomprometimento afeta negativamente os mecanismos imunológicos envolvidos no controle de microorganismos, levando ao aumento da carga de patógenos oportunistas, resistência a medicamentos e infecções frequentes e recidivantes, culminando na modificação da composição e diversidade da microbiota (Gonçalves et al., 2007; Lourenço; Figueiredo, 2008; Berberi et al., 2015). Diversos estudos têm investigado a composição e a complexidade da microbiota oral em indivíduos infectados pelo HIV-1 (Gonçalves et al., 2007; Cembranelli et al., 2013; Pereira et al., 2014). Microorganismos não comumente encontrados no ambiente subgingival têm sido isolados, incluindo bactérias comensais gram-positivas do trato gastrointestinal como *Clostridium difficile* e *Enterococcus faecalis*, bactérias gram-positivas comensais ao trato gastrointestinal; *C. albicans*, *Mycoplasma salivarium*, *Entamoeba gingivalis*, microorganismos comensais ao ambiente oral; *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, bactérias oportunistas que afetam frequentemente as vias respiratórias e o trato urinário. Além disso, patógenos mais tipicamente associados à doença periodontal - *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Tannerella forsythia* (Tf), *Treponema denticola* (Td) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) - foram encontrados em maior frequência em indivíduos infectados pelo HIV-1 com periodontite crônica, mesmo estando sob TARV, em comparação a indivíduos não-infectados pelo HIV-1. Estes achados sugerem a correlação entre as bactérias periodontopatogênicas e destruição periodontal, com destaque para os níveis aumentados de DNA de *P. gingivalis* nos infectados pelo HIV-1, espécie fortemente associada à perda de inserção periodontal e também reativação de vírus latente (Cross; Smith, 1995; Vernon et al., 2009; Bierne et al., 2012).

Espécies do gênero *Neisseria* foram detectadas no biofilme dental e em amostras de saliva de indivíduos infectados pelo HIV-1, mas nenhuma associação

com inflamação, parâmetros imunológicos ou conteúdo funcional dos genes foi determinado (Noguera-Julian et al., 2017). Além disso, *Streptococcus mitis*, que tem o potencial de transferir fatores de virulência para outras bactérias, e *Capnocytophaga sp.*, um conhecido patógeno comensal oportunista envolvido na patogênese de doenças periodontais, foram também detectados em amostras de saliva (Avila et al., 2009; Zhang et al., 2015). *Veillonella parvula*, *Prevotella pallens*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter concisus* e *Megasphaera micronuciform* foram encontrados na microbiota da língua, a qual pode estar associada com lesão de cárie, doença periodontal e infecção sistêmica em indivíduos infectados pelo HIV-1 (Dang et al., 2012).

As infecções fúngicas ganham destaque na infecção pelo HIV-1, já que se instalam facilmente na cavidade oral, em virtude das alterações na função imunológica mediada por linfócitos T, e consequente redução da imunidade do paciente infectado pelo HIV-1 (Canabarro et al., 2013). Como já mencionado anteriormente, na cavidade oral, há o predomínio de infecções causadas por fungos do gênero *Candida spp*, os quais possuem relação comensal com a cavidade oral, mas que assumem características de patogenicidade devido ao estado de imunossupressão (Eggimann et al., 2003). A frequência da candidíase oral nos pacientes infectados pelo HIV-1 é variada, podendo atingir até 90% dos indivíduos infectados, dependendo do estágio da infecção e da população analisada (Saunus et al., 2008; Berberji; Aoun, 2017; Lourenço et al., 2017). Em indivíduos saudáveis, a frequência de *Candida spp* na microbiota residente é descrita entre 30% e 50% (Jainkittivong et al., 1998; Lourenço et al., 2017), enquanto que em indivíduos infectados pelo HIV-1 tal frequência é aumentada para 62% (Costa et al., 2006a,b).

Vários estudos relataram aumento da colonização subgengival por leveduras, particularmente *C. albicans*, em pacientes com periodontite crônica (Canabarro et al., 2013; Peters et al., 2017). 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). Diferentemente dos pacientes infectados pelo HIV-1, a doença periodontal não foi um fator para o aumento de *Candida spp* na cavidade oral de pacientes não infectados pelo HIV-1, ou seja, estes indivíduos apresentaram prevalência e contagem de *Candida spp*

semelhantes, independentemente de suas condições periodontais (Canabarro et al., 2013).

Em síntese, os dados apresentados suportam a recente evidência de que maior e mais complexa diversidade bacteriana pode ser encontrada na microbiota oral de indivíduos infectados pelo HIV-1, em comparação com indivíduos não-infectados. Além da redução dos níveis de linfócitos T CD4+, o uso prolongado de TARV influencia a imunidade oral inata reduzindo o fluxo salivar e a expressão de β -defensina 2, um peptídeo antimicrobiano usado como biomarcador de suscetibilidade ao desenvolvimento de infecção oral e transformação maligna, e outros fármacos que têm impacto adverso na imunidade oral (Nittayananta et al., 2013).

2.3 Biomarcadores salivares na periodontite crônica associada à infecção pelo HIV-1

A inflamação sistêmica decorrente da infecção pelo HIV-1 pode influenciar no avanço da doença periodontal, por meio da expressão dos marcadores inflamatórios, incluindo diferentes citocinas, quimiocinas e peptídeos antimicrobianos, os quais podem ser detectados em diversos fluidos, incluindo a saliva (Holmstrup; Glick, 2002; Alpagot et al., 2004).

Há vasta evidência de que certas citocinas desempenham papel essencial na progressão da doença periodontal, devido às suas propriedades quimiotáticas, inflamatórias e angiogênicas. Ozçaka et al. (2011) verificaram maior expressão da interleucina 18 (IL-18) na saliva de pacientes com periodontite quando comparado a controles saudáveis. De forma semelhante, Figueredo et al. (2008) encontraram altos níveis de IL-18 em bolsas periodontais profundas (>5 mm). Esta citocina pró-inflamatória modula a resposta de linfócitos T auxiliares (Th1). Outras citocinas pró-inflamatórias, notavelmente interleucina 1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6), apresentam um importante papel na resposta imune inata nos tecidos periodontais por meio de sua ação na reabsorção óssea. A detecção de TNF- α , que é produzida principalmente por macrófagos, na saliva e no

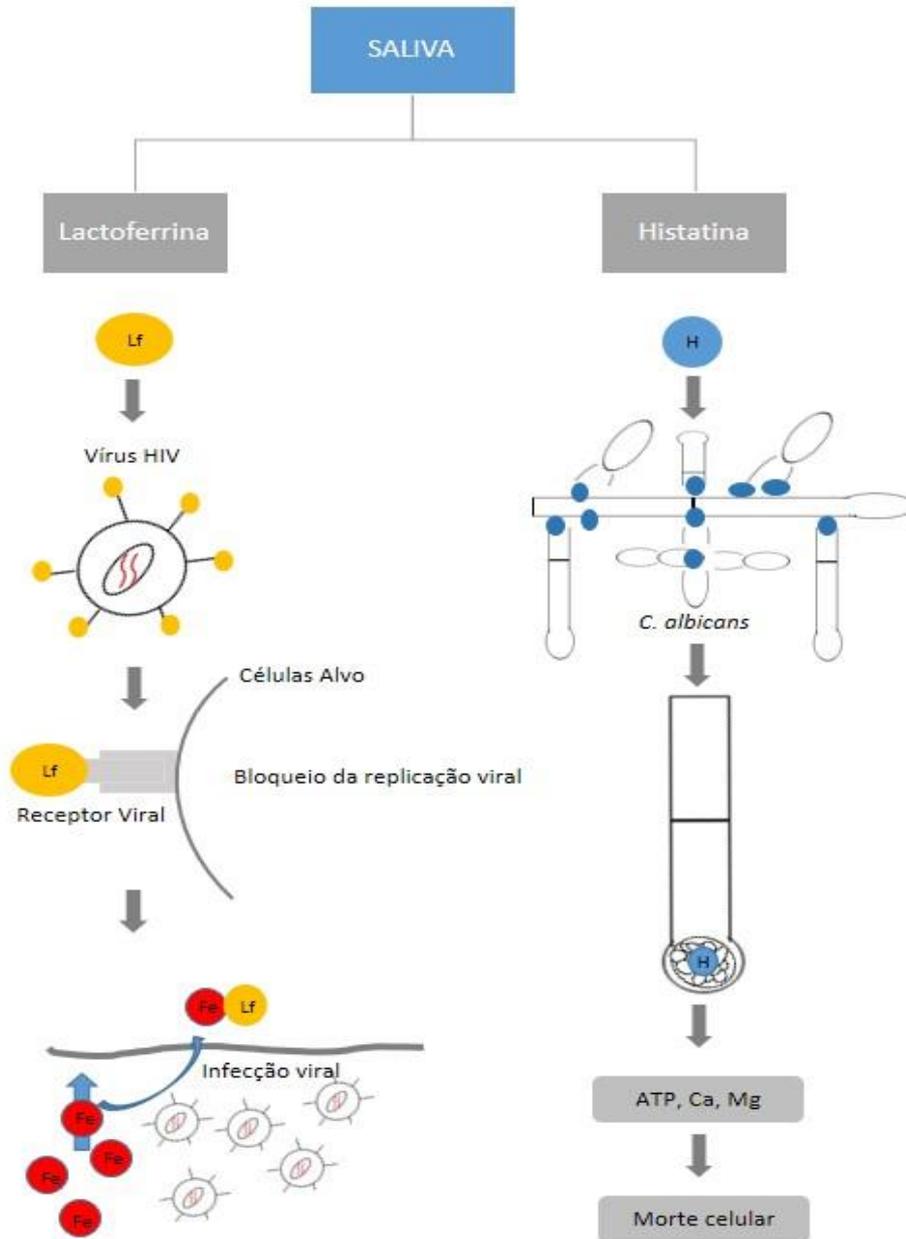
fluido crevicular gengival é diretamente relacionada a destruição tecidual local (5; Boyce et al., 2005; Teles et al., 2009). Neste mesmo contexto, altos níveis de IL-6 são detectados na saliva. Esta citocina estimula a atividade dos osteoclastos, também determina a transição da inflamação agora para a crônica, altera a natureza do infiltrado leucocitário e exerce efeito estimulatório sobre as linfócitos T e B (Gabay, 2006; Costa et al., 2010).

Em pacientes infectados pelo HIV-1, outros biomarcadores podem também exercer papel na patogênese da doença periodontal, como os peptídeos antimicrobianos. Entre eles, a lactoferrina (Lf), uma glicoproteína da família transferrina, que é encontrada em altas concentrações em diferentes secreções corporais, incluindo a saliva (Lourenço et al., 2014). A lactoferrina apresenta um conhecido efeito protetor anti-HIV, por reduzir a habilidade das células dendríticas a identificarem antígenos (Groot et al., 2005). Além disso, ela tem efeito antibacteriano e antifúngico, no sítio da infecção e reduzindo a disponibilidade deste íon, que é essencial para o crescimento microbiano e manutenção da permeabilidade celular fúngica (Gonzalez-Chavez et al., 2009). Em virtude destas características, a Lf tem sido considerada um potencial marcador da doença periodontal em indivíduos imunocompetentes (Lourenço et al., 2013).

Histatina, um peptídeo com potente ação antifúngica, principalmente contra *C. albicans*, e efetivo controle sobre a homeostase oral, é um outro peptídeo antimicrobiano de grande importância na patogênese das doenças orais (Devine, 2003; Melino et al., 2014). Estudos *in vitro* têm demonstrado que a histatina tem a habilidade de eliminar *C. albicans* de maneira dose-dependente (Edgerton et al., 2000; Jang et al., 2010). Histatina se liga aos receptores de membrana do fungo e é translocada para o interior da célula onde se dirige às mitocôndrias, causando liberação de ATP, cálcio e magnésio, levando à morte celular (Koshlukova et al., 1999; Melino et al., 2014) (Figura 2.1). Embora bastante estudada, ainda há poucas pesquisas avaliando os níveis de histatina em indivíduos infectados pelo HIV-1, apresentando doenças orais, como por exemplo a doença periodontal.

Assim, seria importante avaliar mais detalhadamente o papel desses diferentes biomarcadores na patogênese das doenças periodontais em pacientes infectados com HIV-1 sob TARV.

Figura 2.1 - Representação esquemática de peptídeos antimicrobianos salivares envolvidos na patogênese da infecção pelo HIV



Fonte: A autora

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar se o tratamento periodontal é capaz de alterar a contagem oral de *Candida spp* e as concentrações salivares dos peptídeos antimicrobianos lactoferrina e histatina, em pacientes infectados e não infectados pelo HIV-1, correlacionando essas possíveis alterações com a melhora clínica da doença periodontal. Para tal, pretende-se:

- Avaliar a contagem oral de *Candida spp* em pacientes infectados e não infectados pelo HIV-1, antes e após terapia periodontal;
- Avaliar as concentrações dos biomarcadores lactoferrina e histatina na saliva total, de pacientes infectados e não infectados pelo HIV-1, antes e após a terapia periodontal.
- Correlacionar a contagem de *Candida spp* com a concentração salivar de histatina;
- Mensurar diferenças nas características clínicas da doença periodontal antes e após a terapia periodontal em pacientes infectados e não infectados pelo HIV-1, comparando tais grupos entre si.

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Pacientes

Pacientes adultos (≥ 18 anos) infectados e não infectados pelo HIV-1, apresentando periodontite crônica, foram selecionados para este estudo. Os pacientes infectados pelo HIV-1 foram recrutados na Unidade de Especial de Tratamento de Doenças Infecciosas (UETDI), do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), inicialmente a partir da revisão de prontuários médicos. Aqueles selecionados foram entrevistados e submetidos a exame periodontal de triagem, no intuito de determinar a presença ou não da periodontite crônica (Armitage et al., 1994). Finalmente, os pacientes que atenderam a todos os critérios de inclusão (Figura 4.1) foram convidados a participar da pesquisa. Os pacientes não infectados pelo HIV-1 (grupo controle) foram selecionados a partir de casos encaminhados pelas Unidades Básicas de Saúde (UBSs) de Ribeirão Preto, para atendimento na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP (FORP-USP). Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da FORP-USP (ANEXO A), Certificado de Apreciação Ética (CAAE: 50004415.1.0000.5419), e obteve registro no ClinicalTrials.gov sob o número NCT03262402. Todos os pacientes foram orientados quanto aos objetivos da pesquisa, e incluídos no estudo após fornecerem o consentimento livre esclarecido (ANEXO B).

Figura 4.1 - Critérios de inclusão e exclusão empregados no estudo

Critérios	Grupo HIV	Grupo controle
Inclusão	<ul style="list-style-type: none"> • Ter idade superior ou igual a 18 anos; • Aceitar e assinar o termo de consentimento livre e esclarecido; • Possuir mais do que 12 dentes; • Possuir periodontite crônica, com no mínimo dois sítios com profundidade de sondagem >4mm e dois dentes com perda de inserção >4mm. 	
Exclusão	<ul style="list-style-type: none"> • Possuir soropositividade para o HIV-1, confirmada por meio do teste ELISA, em amostras sanguíneas distintas, confirmada por Western Blot; • Apresentar contagem de linfócitos T CD4+ inferior a 200 células/mm³; • Estar em uso de terapia antiretroviral regular, com uso de um inibidor da transcriptase reversa análogo de nucleosídeo, um inibidor da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeo e um inibidor de protease; • Apresentar contagem de linfócitos T CD4+ e carga viral recente (três meses antes ou três meses depois da abordagem inicial da pesquisa). 	

Fonte: A autora

4.2 Delineamento de estudo

Trata-se de um modelo quase-experimental com dois grupos de estudo que foram constituídos por conveniência, durante o período de janeiro de 2016 a novembro de 2017. Todos participantes foram submetidos a exame clínico-anamnésico, coleta de saliva total, enxaguado bucal, fluido crevicular gengival e tecido gengival (os dois últimos para estudos futuros), em diferentes tempos, para as análises laboratoriais do estudo, conforme demonstrado pela figura 4.2. O detalhamento será feito apenas para as coletas pertinentes ao presente estudo.

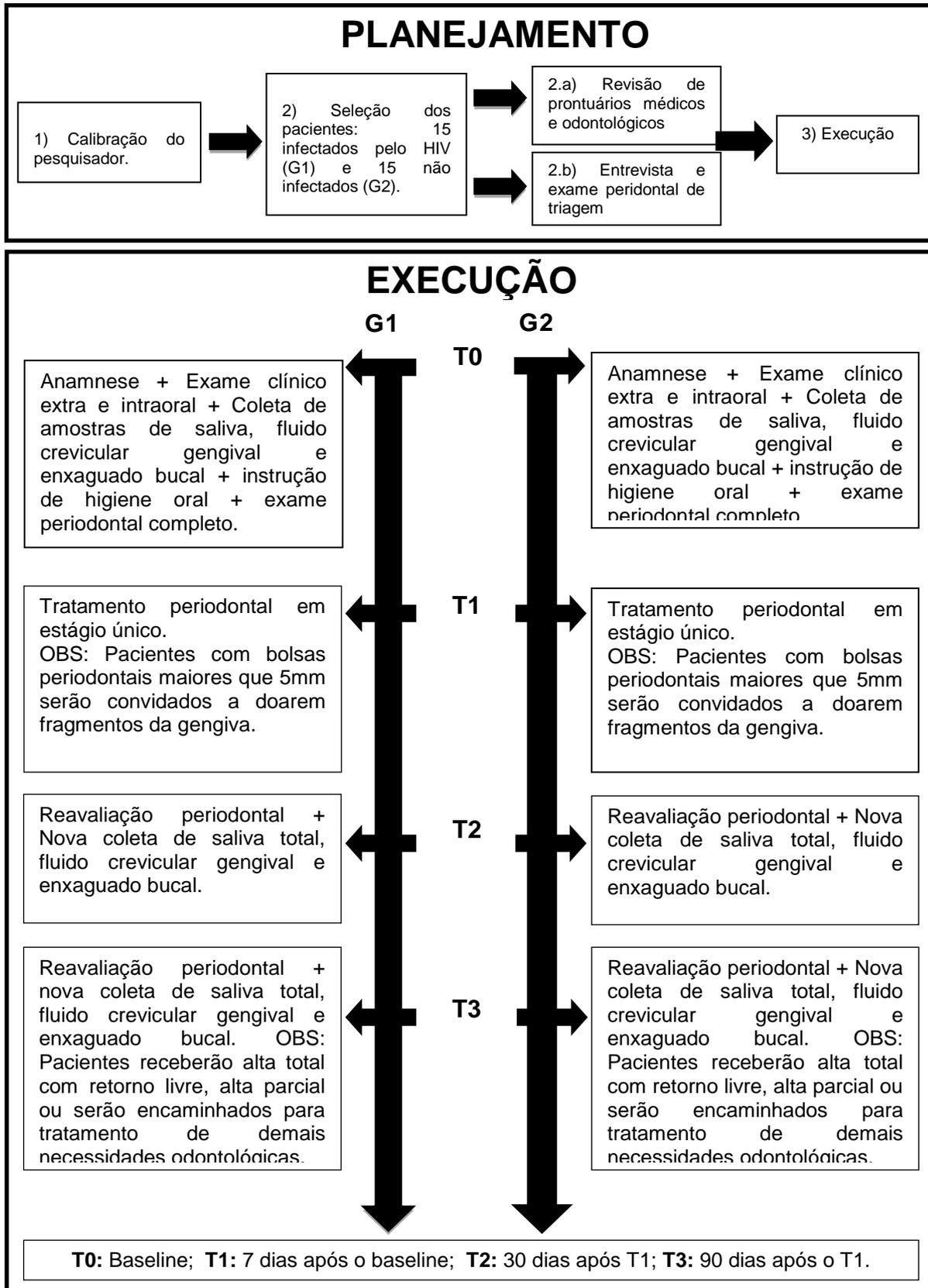
Tempo 0: Foram realizados exame clínico-anamnésico, coleta de saliva e enxaguado bucal. Após as coletas, os pacientes receberam instruções de higiene oral.

Tempo 1: Após 7 dias da consulta inicial, os pacientes foram submetidos a tratamento periodontal não-cirúrgico em estágio único. A terapia periodontal foi realizada em um intervalo de 48 horas, por meio de raspagem (supragengival e subgengival) e aplainamento radicular de toda a boca 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 e enxaguado bucal 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 de reavaliação, coleta de saliva total e enxaguado bucal. As coletas da pesquisa foram então concluídas, e os pacientes receberam alta parcial, retorno livre ou foram encaminhados para tratamento de suas outras necessidades.

Figura 4.2 – Fluxograma etapas do estudo



4.3 Coleta dos dados clínicos

Anamnese: A anamnese foi realizada por meio de questionário contendo perguntas sobre as condições médico-odontológicas dos pacientes (ANEXO C). Algumas questões foram dirigidas diretamente ao entrevistado, como: dados pessoais, automedicação e a história odontológica. Informações sobre tempo de soropositividade para o HIV-1, tempo de tratamento, ganho ou perda recente de peso, medicamentos em uso, valores de linfócitos T CD4+, carga viral, classificação da infecção pelo HIV (Centers for Disease and Prevention, 1993) e histórico de manifestações oportunistas, foram obtidas por meio de consulta ao prontuário médico.

Exame físico intra e extraoral: O exame físico teve início pela palpação dos linfonodos em região de cabeça e pescoço buscando alterações de volume, consistência e temperatura (ANEXO D). Ao exame extraoral foram avaliadas alterações cutâneas faciais e perilabiais: comissuras labiais, lábios, nariz, região do processo zigomático da maxila e região mentual. Ao exame intrabucal foi realizada a avaliação dos tecidos moles: língua, assoalho bucal, gengiva, mucosa jugal, palato duro, palato mole e tonsilas. As manifestações orais associadas à infecção pelo HIV-1 foram catalogadas de acordo com a classificação preconizada por 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, 1993). Após o exame físico de partes moles, o paciente foi convidado a enxaguar bucal para quantificação de *Candida spp*, e teste de fluxo salivar não-estimulado.

Parâmetros clínicos periodontais: O exame periodontal (ANEXO E) foi realizado após a coleta de saliva, para evitar contaminação da amostra por sangramento gengival. Foram determinados os parâmetros: índice de sangramento gengival (IS), profundidade à sondagem (PS) e nível de inserção clínica (NIC). Para a determinação do IS, os sítios sangrantes após a sondagem foram registrados e calculados o percentual de sangramento gengival. A determinação da PS correspondeu à distância entre a margem gengival e a base do sulco gengival. Para essa mensuração a sonda periodontal foi introduzida entre o dente e a gengiva

paralelamente ao longo eixo do dente, respeitando-se o contorno dental. Todas as profundidades de bolsa superiores a três milímetros foram registradas. Finalmente, para a determinação da NCI, a distância entre a base do sulco gengival e a junção amelo-dentinária foi registrada. Para essa mensuração a sonda foi introduzida paralelamente ao longo eixo do dente, respeitando-se o contorno dental. Foram anotadas todas as perdas clínicas de inserção superiores a três milímetros. Todos os dentes presentes (exceto os terceiros molares) foram avaliados, com sonda milimetrada, em seis sítios: sitio mesio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual/palatino, lingual/palatino, disto lingual/palatino, e três diferentes mensurações foram feitas para os parâmetros PS e NCI. O diagnóstico da periodontite crônica foi estabelecido com base na presença de pelo menos 2 sítios com PS > 4mm e pelo menos 2 sítios com PCI > 4mm.

4.4 Coleta das amostras

Saliva: Para a coleta da saliva 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 ficaram sentados, com a cabeça levemente inclinada para frente, expectorando a saliva por cinco minutos, em frasco colocado abaixo do lábio inferior. Todas as amostras foram coletadas entre oito e dez horas da manhã, e foram levadas ao laboratório e centrifugadas a 800 rotações por minuto, por 30 minutos a 4°C. A saliva foi alicotada em criotubos e imediatamente congelada à – 80°C até a realização das análises (Schenkels et al., 1995).

Enxaguado bucal: Amostras de enxaguado bucal foral obtidas a partir de bochecho com PBS para quantificar *Candida spp*, pela técnica descrita por Samaranayake et al. (1986). Um dia antes da coleta, foram preparados os frascos contendo 10 ml de PBS (pH 7,3; 0,1 M) e esterilizados em autoclave. Esses frascos contendo PBS estéril foram acondicionados em temperatura de 4°C à 10°C até seu uso. O participante realizou o bochecho com 10 ml de PBS por 60 segundos e em seguida realizou expectoração dentro de um coletor universal. O coletor universal foi

acondicionado em recipiente refrigerado a 4°C, e conduzido imediatamente ao laboratório onde foi centrifugado a 2.000 rotações por minuto, durante 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o resíduo sólido depositado no fundo do tubo de 15mL, ressuspendido em PBS até atingir 1ml de solução. A partir desse 1ml de solução obtido, foi realizada a semeadura em meio de cultura, conforme descrição no item **Análises laboratoriais**.

4.5 Análises laboratoriais

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 colonização por *Candida spp* em Ágar Sabouraud-dextrose. As culturas positivas foram contadas para determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC/ml) (Figura 4.3).

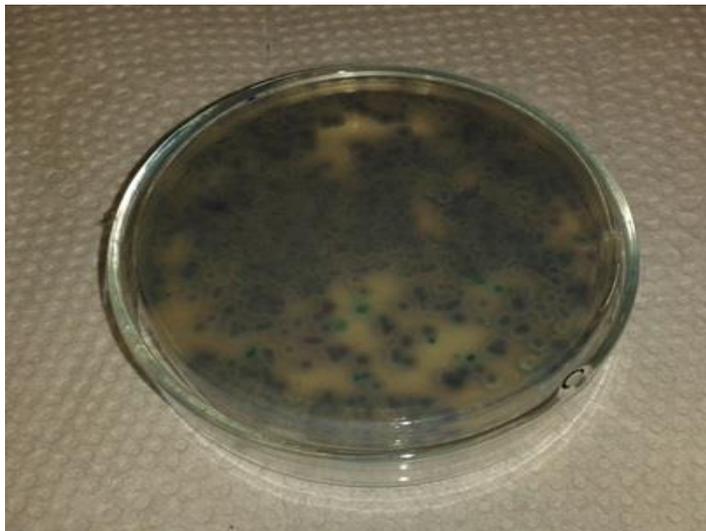
Determinação de espécies de Candida spp: Para realizar essa análise foi feita a técnica de semeadura em meio cromogênico, semeando 100µL da amostra pura do enxaguado bucal em placas de Petri, em meio “CHROMagar™ *Candida*”, e incubadas em estufa de cultura a 37°C, por 48 horas (Figura 4.4). A identificação foi feita de acordo com a pigmentação das leveduras, sendo a cor verde claro indicativa de *C. albicans*, e as outras cores, que variaram de azul escuro, rosa e malva escuro, indicando *C. não-albicans*, conforme descrito pelo fabricante (CHROMagar™ *Candida*, DIFCO/BBL).

Figura 4.3 - Colonização por *Candida* em Ágar Sabouraud-dextrose



Fonte: A autora

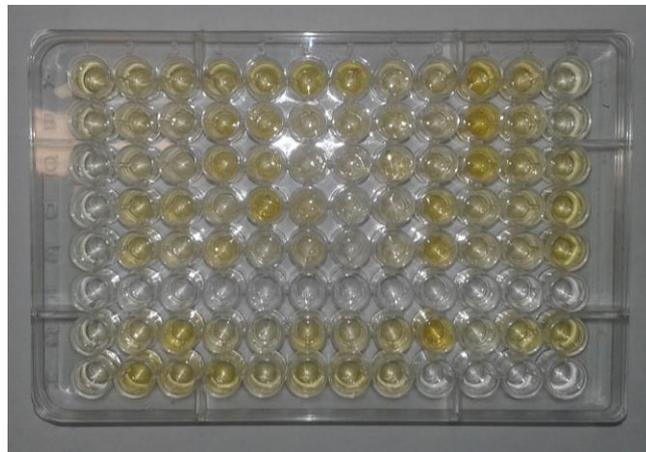
Figura 4.4 - Colonização por *Candida* em meio "CHROMagar™ *Candida*"



Fonte: A autora

Dosagem da lactoferrina na saliva: Os níveis salivares de lactoferrina foram determinados por ELISA. Resumidamente, realizaram-se diluições seriadas de lactoferrina (Lactoferrin from human Milk, SIGMA), em concentração inicial de 5µg/ml. Adicionou-se 100µl de cada concentração de lactoferrina por poço, em duplicata, para realizar o padrão. Foram diluídos 200µl saliva de cada paciente em 800µl de PBS, e, em seguida, a saliva 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 100uL/poço do anticorpo primário policlonal anti-lactoferrina humana (sheep anti human lactoferrin: hrp ab-dierct), 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 100uL por poço do anticorpo secundário (Rabbit Anti-Sheep IgG H&L (HRP) ab97130), em concentração 1: 2.000, deixando em incubação por 90 minutos, em temperatura ambiente. Após novas lavagens com PBS, foi realizada a revelação com o-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD) (SIGMA) 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) (Figura 4.5).

Figura 4.5 - Microplaca para dosagem de lactoferrina pela técnica ELISA direto



Fonte: A autora

Dosagem de histatina na saliva: Os níveis salivares de histatina também foram determinados por ELISA. Resumidamente, diluições seriadas de Histatin (N-20; sc-28110P, Santa Cruz) em concentração inicial de 5µg/ml foram inoculadas por poço (100µl de cada concentração), em duplicata. Duzentos microlitros de saliva diluído em 800µl PBS foram adicionadas à placa de ELISA, em duplicata (100µl por poço), e incubadas em temperatura ambiente por um período de 12 horas (overnight). Após a incubação, foi realizado o bloqueio da placa com 200µl/poço de ovalbumina a 10%, (Sigma Albumin from Chicken Egg Whites Grade II), durante 2 horas, em temperatura ambiente. Após bloqueio, foi adicionado 100uL por poço do anticorpo primário policlonal de cabra anti-histatina humana (Histatin - N20; sc 28110, Santa Cruz), diluído em ovalbumina 1%, na concentração de 1:300, e incubado durante duas horas, em temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS, foi adicionado 100uL por poço do anticorpo secundário (donkey anti-goat IgG-HRP: sc-2020, Santa Cru), diluído em ovalbumina 1%, na concentração de 1:2.000, e incubado por 90 minutos, em temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS, a reação foi revelada com o-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD) (SIGMA) seguindo as recomendações do fabricante. A placa foi então incubada, em temperatura ambiente, na ausência de luz, por 45 minutos, e em seguida a leitura foi realizada empregando absorbância à 450nm, por meio de leitor de ELISA (DIATECH).

4.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas considerando-se testes bicaudais e alfa de 0.05. As 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, 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.

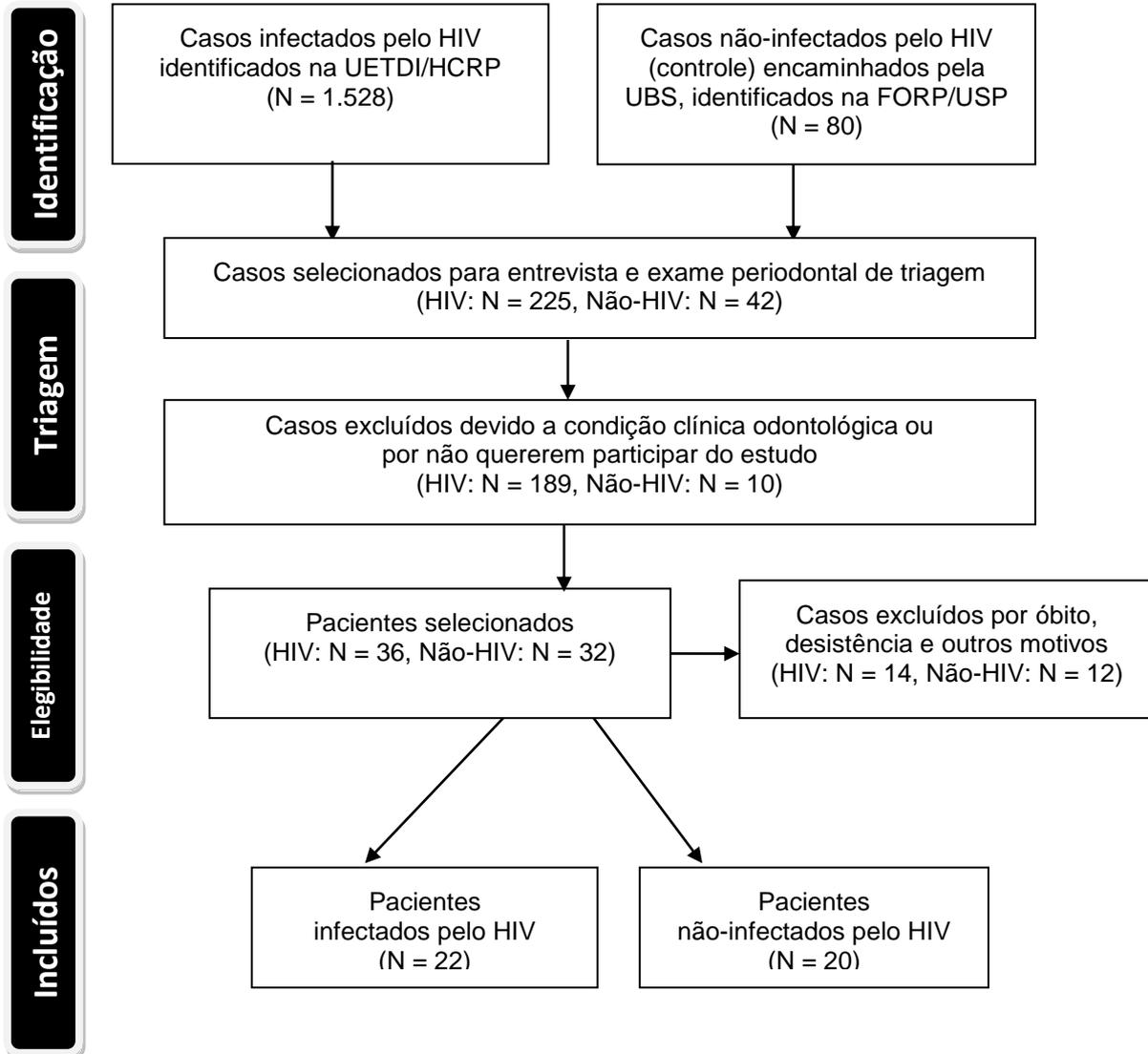
No caso de desfechos com distribuições não normais (não definidas) o teste de Friedman foi empregado. Comparações entre os dois grupos e ao longo do tempo para distribuições normais, foram realizadas por meio de modelos mistos considerando o indivíduo como fator aleatório, e as variáveis grupo e tempo 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

Mil, quinhentos e vinte oito pacientes infectados pelo HIV foram identificados por meio da revisão de prontuários médicos da UETDI, HCFMRP-USP e 80 pacientes não-infectados pelo HIV, encaminhados por UBSs de Ribeirão Preto, foram identificados na FORP-USP (Figura 5.1). Em relação aos pacientes infectados pelo HIV, 1.303 foram excluídos por não atenderem as condições clínicas laboratoriais, e assim, 225 foram submetidos ao exame periodontal de triagem. Destes, 189 foram excluídos por não atenderem as condições clínicas odontológicas, e 36 foram submetidos ao tratamento periodontal, 14 pacientes foram excluídos durante o tratamento, devido a óbito (n=1) abandono de tratamento (n=12) ou por voltarem a fumar (n=1), entretanto 22 concluíram todas as etapas do estudo. Em relação aos pacientes do grupo controle, dos 80 pacientes inicialmente identificados, 38 foram excluídos por não corresponderem a condição clínica odontológica, 42 foram submetidos à avaliação periodontal de triagem. Destes, 10 foram excluídos por não quererem 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 voltarem a fumar (n=5). Destes, 20 concluíram todas as etapas da pesquisa.

Figura 5.1 - Fluxograma demonstrando o processo de identificação e seleção dos pacientes incluídos no estudo



Fonte: A autora

Os resultados clínicos e demográficos estão descritos na tabela 5.1. Dos 22 pacientes do grupo 1, 14 (63,6%) foram do sexo masculino e 08 (35,4%) do sexo feminino, com idade média de 45 (27-54) anos e de 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%), 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 2, 4 foram do sexo masculino e 16 (80%) do sexo feminino, com idade média de 48 (22-75) anos, e também de cor branca (n=19; 95%). A maioria dos pacientes (n=8; 40%) apresentou ensino médio completo e eram casados (n=16; 80%). Das infecções oportunistas, apenas candidíase oral foi detectada neste grupo (n= 3; 15%).

Os parâmetros imunológicos dos pacientes do grupo 1 estão descritos na tabela 5.2. Esses pacientes possuíam tempo médio de infecção pelo HIV de 13,5 ($\pm 7,2$) anos, o tempo médio de tratamento da doença foi 10,7 ($\pm 8,5$) anos, cerca de 14 (63,6%) declararam que a forma de contaminação por HIV ocorreu pela via sexual, 1 (4,5%) participante declarou a contaminação por transfusão de sangue e 7 (31,9%) não souberam informar a forma de contágio. Todos os participantes do grupo 1 estavam em uso de terapia antirretroviral, que foi dividida em cinco esquemas, a maioria (n=12, 54,5%) utilizavam a combinação de inibidor de transcriptase reversa análogo nucleosídeo e inibidor de protease (TARV 4), 4 pacientes (18,2%) utilizavam inibidor de integrase e inibidor de protease (TARV 3), 3 pacientes (13,6%) utilizavam inibidor de transcriptase reversa análogo de nucleosídeo e inibidor de transcriptase reversa não-análogo nucleosídeo (TARV 2), 2 pacientes (9,1%) utilizavam inibidor de transcriptase reversa análogo nucleosídeo, inibidor de protease e inibidor de integrase (TARV 5), e 1 paciente (4,5%) utilizava inibidor de transcriptase reversa análogo de nucleosídeo, inibidor de protease, inibidor de integrase e inibidor de entrada (TARV 1). A maioria apresentou contagem de linfócitos T CD4+ inferior a 200 cel/mm³ no tempo 1, evoluindo com aumento significativo ($p = 0,0064$) da contagem dessas células ao final do estudo (tempo 3). A variação da carga viral plasmática foi semelhante nos diferentes tempos do estudo ($p= 0,2984$).

Tabela 5.1 - Perfil clínico e demográfico dos pacientes infectados e não infectados por HIV

Variáveis	Grupo 1 (HIV+)	Grupo 2 (Não-HIV)	Valor de p
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			
Ensino Fundamental Incompleto	09 (40,9%)	07 (35%)	0,4081
Ensino Fundamental Completo	04 (18,2%)	03 (15%)	
Ensino Médio Incompleto	05 (22,7%)	02 (10%)	
Ensino Médio Completo	04 (18,2%)	08 (40%)	
Situação conjugal			
Casado	05 (22,7%)	16 (80%)	0,0001
União estável	02 (9,1%)	00 (0%)	
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%)	
Perda ou ganho de peso			
Sim	16 (72,7%)	11 (55%)	0,2311
Não	06 (27,3%)	09 (45%)	
Infecções oportunistas			
Sim	18 (81,8%)	3 (15%)	0,0001
Não	04 (18,2%)	17 (85%)	

Fonte: A autora

Tabela 5.2 - Parâmetros imunológicos da infecção pelo HIV

	Média ± DP	Mediana	Q1-Q3	Mínimo - Máximo	Valor de p
Tempo de infecção (anos)	13,5 ± 7,2	15,0	7 - 17	2 – 29	*
Tempo de tratamento (anos)	10,7 ± 8,5	10,5	3 - 15	0,25 – 29	*
Linfócitos TCD4+ (cel/mm³)					
Tempo 1	104,7 ± 57,3	105,0	66 – 140	11 – 206	0,0064
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 (cópias/ml)					
Tempo 1	1.444.892,27 ± 423.174,5	40	40 – 106.931	40 – 1.941.107	0,2984
Tempo 2	19.547,4 ± 66.181,4	40	40 – 249.000	40 – 282.443	
Tempo 3	28.380,8 ± 103.229,3	40	40 – 239.000	40 – 461.382	

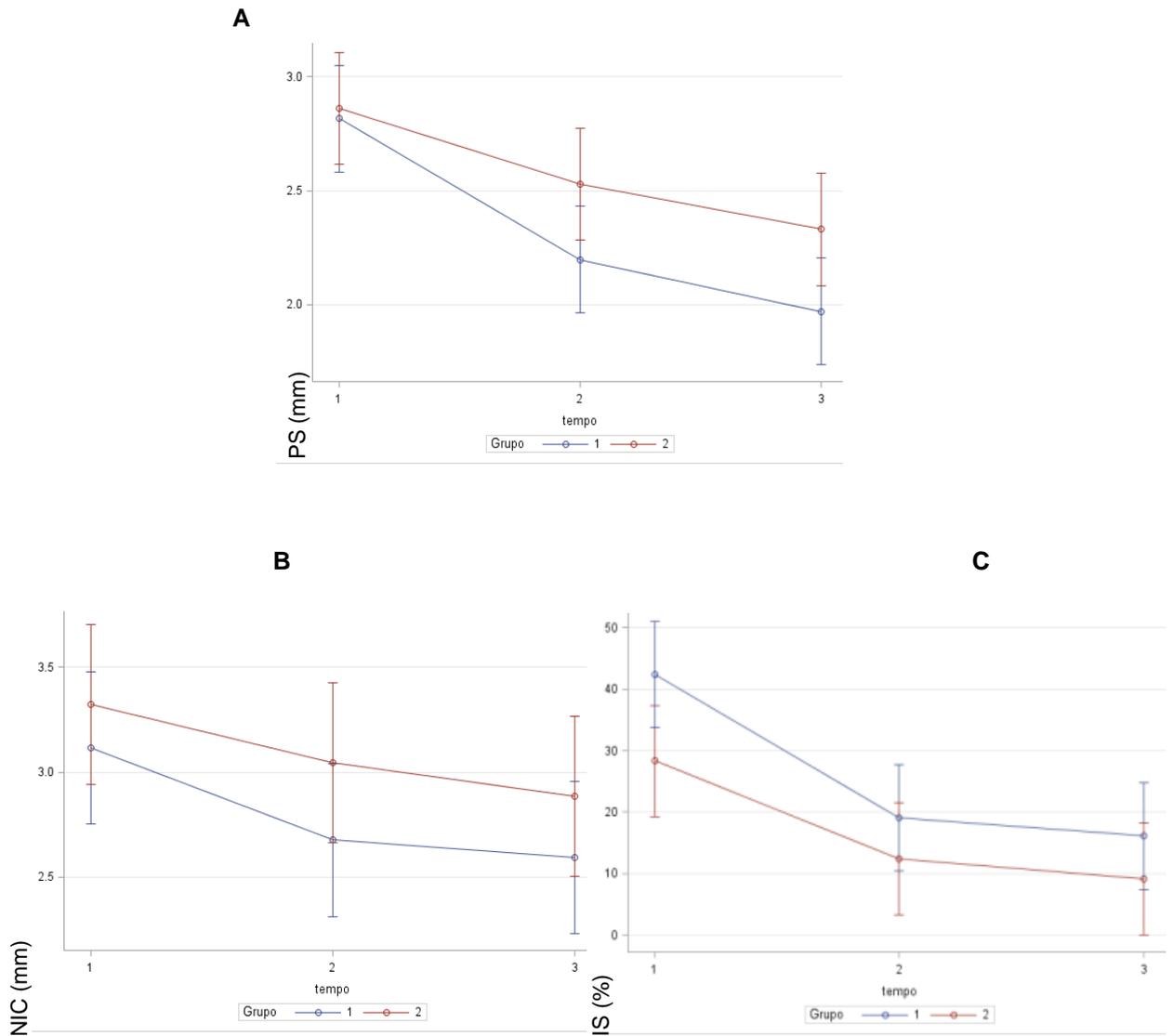
DP = Desvio padrão ; * = análise descritiva

Fonte: A autora

5.2 Parâmetros clínicos periodontais

A descrição detalhada dos parâmetros clínicos periodontais encontra-se na figura 5.2 e tabela 5.3. O tratamento periodontal não-cirúrgico foi responsável pela redução dos parâmetros clínicos da doença periodontal nos pacientes de ambos os grupos. Entre os pacientes do grupo 1, verificou-se IS de 42,4%, e médias da PS $2,8 \pm 0,1$ mm e NIC $3,1 \pm 0,2$ mm antes do tratamento periodontal. Esses índices foram reduzidos para 19,1% do IS, e médias de PS de $2,2 \pm 0,1$ mm e de NIC de $2,7 \pm 0,2$ mm 30 dias após o tratamento, e aos 90 dias verificou-se 16,1% do IS, e médias de PS de $2,2 \pm 0,1$ mm e de NIC de $2,6 \pm 0,2$ mm. A redução do índice de sangramento e profundidade de sondagem foram estatisticamente significante, entre os três tempos de estudo ($p = < 0,0001$; teste qui-quadrado) e também houve diminuição significativa no nível clínico de inserção ($p = 0,0013$; teste qui-quadrado). Por outro lado, nos pacientes do grupo 2 verificou-se IS de 28,3%, e médias da PS $2,9 \pm 0,1$ mm e NIC $3,3 \pm 0,2$ mm antes do tratamento periodontal. Esses índices foram reduzidos para 12,4% do IS, e médias de PS de $2,5 \pm 0,1$ mm e NIC de $3,0 \pm 0,2$ mm 30 dias após o tratamento, e 90 dias após o tratamento periodontal verificou-se 9,1% do IS, e médias de PS de $2,3 \pm 0,1$ mm e NIC de $2,8 \pm 0,2$ mm. O tratamento periodontal trouxe melhora nos parâmetros clínicos da doença periodontal no grupo 2 reduzindo de forma significativa índice de sangramento e profundidade de sondagem nos três tempos do estudo ($p = < 0,0001$ – teste qui-quadrado) e também houve diminuição significativa no nível clínico de inserção ($p = 0,0001$ - teste qui-quadrado).

Figura 5.2 – Mediana e 95% de intervalo de confiança. Resposta do tratamento periodontal nos diferentes tempos do estudo, a profundidade de sondagem (a) a interação entre as etapas de tratamento está borderline ($p=0,0793$) e o tempo foi significativo, houve melhora no grupo controle no nível clínico de inserção (b), porém estatisticamente não significativa e não teve interação com o tempo de tratamento ($p=0,6523$) e índice de sangramento (c) o comportamento de variação de sangramento ao longo do tempo não foi diferente, assim como os grupos não foram estatisticamente diferentes ($p = 0.0873$) sendo apenas o tempo relevante no declínio de sangramento para os dois grupos ($p < 0.001$)



Fonte: A autora

Tabela 5.3 - Parâmetros clínicos periodontais

Parâmetros	Grupo 1 (HIV+)			Valor de p	Grupo 2 (Não-HIV)			Valor de p
	Média ± EP				Média ± EP			
	T1	T2	T3		T1	T2	T3	
IS (%)	42,4 ± 4,3	19,1 ± 4,3	16,1 ± 4,3	<0.0001	28,3 ± 4,6	12,4 ± 4,6	9,1 ± 4,6	< 0.0001
PS (mm)	2,8 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,2 ± 0,1	<0.0001	2,9 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,3 ± 0,1	< 0.0001
NIC (mm)	3,1 ± 0,2	2,7 ± 0,2	2,6 ± 0,2	0.0013	3,3 ± 0,2	3,0 ± 0,2	2,8 ± 0,2	0.0001

IS = índice de sangramento; PS = profundidade de sondagem; NIC = nível clínico de inserção; EP = Erro padrão

Fonte: A autora

5.3 Contagem oral de *Candida spp*

Os pacientes do grupo 1 apresentaram, em média, maior número de UFC antes do início do tratamento periodontal, quando comparado à contagem aos 30 dias e 90 dias após o tratamento periodontal, sem entretanto ter mostrado diferenças estatisticamente significantes entre os tempos do estudo, conforme os dados apresentados na tabela 5.4. O mesmo comportamento foi observado nos pacientes do grupo 2. O teste de comparação entre os grupos mostrou que não houve diferença significativa entre os grupos nos diferentes tempos, foi aplicado ANOVAF como teste não paramétrico, apenas no grupo de indivíduos que apresentaram *Candida* os grupos não se mostraram estatisticamente diferentes ($p = 0,3946$), nem mesmo o tempo ($p = 0,6196$) e interação também não foi significativa ($p = 0,4874$). Em relação às espécies, os dados foram dicotomizados em *C. albicans* e *C. não-albicans*. Verificou-se predomínio de *C. albicans* em ambos os grupos.

Tabela 5.4 - Contagem oral de UFC (desvio padrão) de *Candida spp* e frequência de espécies (*C. albicans* ou *C. não-albicans*) os pacientes dos grupos 1 e 2, e nos diferentes tempos do estudo

	Grupo 1 (HIV +) Média ± DP			Valor de P	Grupo 2 (Não-HIV) Média ± DP			Valor de P
	T1	T2	T3		T1	T2	T3	
UFCs/ml	583,3 ± 1800,5	110,1 ± 219,4	156,2 ± 347,9	0,2683	62,3 ± 154,6	43,6 ± 102,3	54,2 ± 145,1	0,2359
Mediana (Q1-Q3)	0,5 (0-215)	0,5 (0-87)	0 (0-162)		0,5 (0 -14,5)	0 (0-25)	0 (0-35)	
Mín – Máx	0 - 8400	0 - 704	0 -1570		0 – 600	0- 349	0 - 579	
<i>C. albicans</i> (%)				0,7088				0,5630
Não	13 (59,1%)	14 (63,6%)	14 (63,6%)		14 (70%)	13 (65%)	16 (80%)	
Sim	09 (40,9%)	08 (36,4%)	08 (36,4%)		06 (30%)	07 (35%)	04 (20%)	
<i>C.não albicans</i> (%)				0,3125				0,3220
Não	20 (90,9%)	19 (86,4%)	20 (90,9%)		18 (90%)	20 (100%)	20 (100%)	
Sim	02 (9,1%)	03 (13,6%)	02 (9,1%)		02 (10%)	0 (0%)	0 (0%)	

UFCs = Unidades Formadoras de Colônias; DP = Desvio padrão

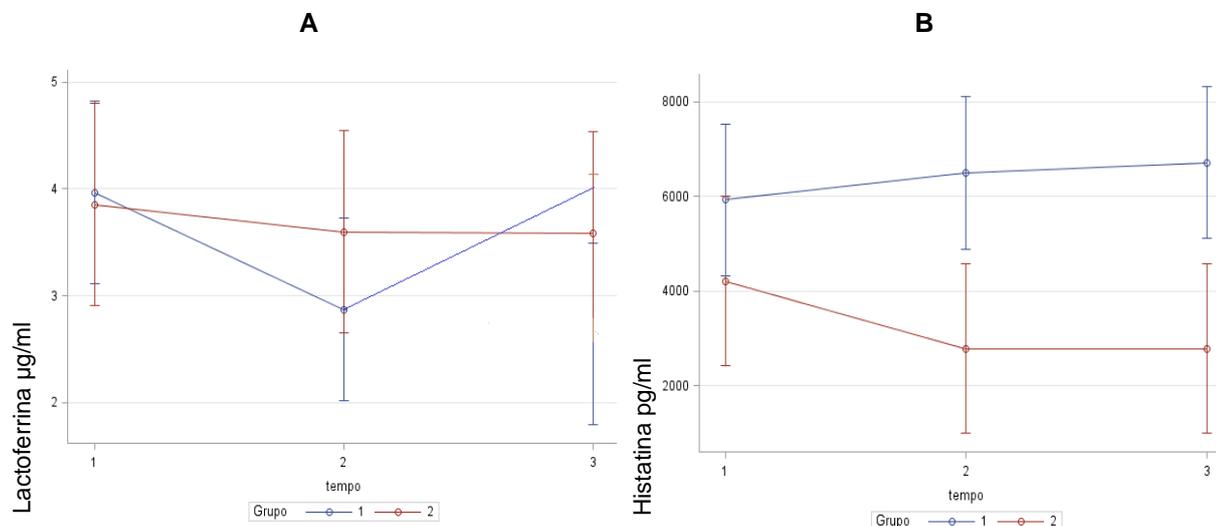
Fonte: A autora

5.4 Comportamento da lactoferrina e histatina na saliva

O comportamento da lactoferrina e histatina ao longo dos tempos do estudo está demonstrado na figura 5.3 e tabela 5.5. Ao tempo 1, as concentrações médias de lactoferrina salivar foram de $4,0 \pm 1,68$ $\mu\text{g/ml}$ e $3,85 \pm 1,90$ $\mu\text{g/ml}$ para os pacientes do grupo 1 e 2, respectivamente ($p=0,0111$) e ($p=0,8603$), teste utilizado para essas análises Mann Whitney. O tratamento periodontal foi responsável pela diminuição dos níveis de lactoferrina salivares em ambos os grupos, entretanto houve aumento dos níveis da lactoferrina ao tempo 3 (90 dias após o tratamento periodontal), no grupo 1.

Em relação à histatina, no tempo 1, as concentrações médias de histatina salivar foram de $5927,7 \pm 3036$ pg/ml e $4212,4 \pm 5562$ pg/ml para os pacientes do grupo 1 e 2, respectivamente ($p=0,6481$) e ($p=0,9490$), Tukey-kramer. A histatina aumenta sutilmente com o tempo no grupo 1, enquanto o grupo controle diminui. Entretanto o tempo não foi estatisticamente significativo ($p=0,8162$), e não foi possível encontrar interação entre o tempo e grupo ($p=0,2163$). De forma geral, apenas os grupos são consistentemente diferentes ao longo do estudo ($p=0,0010$). Esses valores referem-se ao pos-test de Tukey-Kramer. Foi realizado modelo misto com indicação de fator aleatório.

Figura 5.3 – Mediana e 95% de intervalo de confiança. Comportamento da lactoferrina (a) e histatina (b) ao longo do tempo, nos dois grupos



Fonte: A autora

Tabela 5.5 - Contagem de lactoferrina e histatina nos grupos 1 e 2 nos diferentes tempos do estudo

Marcador	Grupo 1 (HIV +) Média ± DP/EP			Valor de P	Grupo 2 (Não HIV) Média ± DP/EP			Valor de P
	T1	T2	T3		T1	T2	T3	
Lactoferrina (µg/ml)	4,0	2,8	4,1	0,0111	3,8	3,6	3,6	0,8603
DP	±1,68	±1,68	±1,68	-	±1,90	±1,90	±2,27	-
EP	±0,40	±0,40	±0,40	-	±0,40	±0,40	±0,40	-
Histatina (pg/ml)	5927,7	6504,8	6717,7	0,6481	4212,4	2792,1	2789,0	0,9490
DP	±3036	±4159	±4230	-	±5562	±1727	±1665	-
EP	±839,64	±839,64	±839,64	-	±839,64	±839,64	±839,64	-

DP = desvio padrão; EP = erro padrão; Lactoferrina = grupo 1 (n=21) e grupo 2 (n=17); Histatina = grupo 1 (n=20) e grupo 2 (n=17);

Fonte: A autora

6 DISCUSSÃO

A média de idade dos participantes com HIV foi de 45 anos ($\pm 5,8$), o fator sexo mostra que número de homens infectados pelo HIV (63,6%) foi maior que mulheres infectadas (35,4%), mostrando que a doença ainda é mais comum em homens. Com relação à cor da pele autodeclarada 68,2%, consideravam-se brancos. Esses valores encontrados no grupo HIV+ do nosso estudo, são similares aos registrados no Sistema Nacional de Informação de Agravos de Notificação (Sinan, 2017) divulgados no Boletim epidemiológico HIV/Aids 2017 (Brasil, 2017).

O tratamento periodontal não-cirúrgico foi responsável pela redução significativa nos parâmetros clínicos da doença periodontal nos pacientes de ambos os grupos. O tempo de tratamento foi importante para redução do índice de sangramento em ambos os grupos ($p = <0,0001$). A profundidade de bolsa entre os grupos ao longo do estudo, teve diminuição significativa ao longo do tempo ($p < 0.0001$), foi observado que houve interação borderline significativa entre o tempo e os grupos ($p = 0.0793$), embora o valor seja borderline, significa que o grupo HIV+ teve uma diminuição de profundidade de sondagem muito mais acentuada do que o grupo não HIV.

O tempo de tratamento foi importante no declínio de NIC para ambos os grupos, embora não significativo ($p=0,6523$) o grupo de pacientes não infectados por HIV teve uma melhora maior do NIC quando comparado aos pacientes HIV+. A perda de inserção clínica e a pouca melhora nesse parâmetro periodontal em pacientes infectados por HIV, pode está relacionado a redução na contagem de linfócitos T CD4+ T cells, como descrito em outros estudos (Barr et al., 1992; Nery et al., 1994; Saunus et al., 2008; Berberi et al., 2015). Considerando que os indivíduos avaliados nesse estudo apresentavam contagem de LTCD-4+ inferior a 200 células/mm³.

No presente estudo verificamos prevalências semelhantes de diferentes espécies de *Candida spp* a partir de enxaguado bucal de pacientes infectados e não infectados pelo HIV, acometidos pela periodontite crônica. Alguns trabalhos descrevem a presença de *Candida spp* e variação dos resultados divergem na

literatura. Kamtane et al., em 2013, relata frequência de espécies do gênero *Candida* em 15% dos pacientes não infectados pelo HIV e em 55% dos pacientes infectados pelo HIV. Em outros estudos esses valores variam entre 44% e 62% relatando a colonização de leveduras em pacientes HIV (Costa et al., 2006a,b; Hung et al., 2005; Delgado et al., 2009).

No presente estudo, verificamos a presença de *Candida spp* em 40 % dos pacientes não infectados pelo HIV e 50% dos pacientes infectados pelo HIV. A variação entre os resultados diferentes dos estudos, pode estar relacionada à metodologia usada para a coleta, como uso de swabs, coleta de saliva total e enxaguado bucal. Segundo Samaranayake et al. (1986), a técnica mais sensível para a quantificação e detecção de *Candida spp* é o uso de enxaguado bucal, método adotado no presente trabalho.

Um dos principais resultados desse estudo foi a queda de contagem de UFCs de *Candida spp* em pacientes infectados pelo HIV após o tratamento periodontal, durante os diferentes tempos, embora não tenha sido encontrada diferenças estatísticas nesse resultado. Os pacientes infectados pelo HIV representaram média maior de UFC, antes da terapia periodontal. Diferentemente dos pacientes HIV +, o tratamento periodontal não influenciou a redução da contagem de *Candida spp* na cavidade oral de pacientes não infectados pelo HIV. Isso provavelmente ocorreu pela menor contagem de *Candida spp* nesses pacientes antes do tratamento periodontal.

Os participantes não infectados pelo HIV apresentaram, em média, 62,3 ($\pm 154,6$) UFC/mL, antes do tratamento periodontal, mesmo sem a significância estatística, esse resultado descreve tendência de maior contagem de *Candida spp* na cavidade oral de pacientes HIV+. Pelo fato da contagem de *Candida spp* ser maior nesses pacientes, em média 583, 3 ($\pm 1800,5$) no baseline, a redução na contagem de *Candida spp* foi mais expressiva frente ao tratamento periodontal. A contagem de LTCD-4+ inferior a 200 células/mm³, atribuída aos participantes, permite tornar essa faixa de pacientes mais susceptíveis ao aparecimento de manifestações oportunistas, como a candidíase. Evidenciamos a partir dessa análise, que uma condição oral adequada pode prevenir a candidíase oral em pacientes infectados pelo HIV (Fong et al., 1997).

A *Candida albicans* foi encontrada em ambos os grupos, resultado esperado em nosso trabalho, pois algumas pesquisas associam a presença *C. albicans* como agravante da condição periodontal. Sugerindo que as duas condições presentes simultaneamente resultam na piora da condição oral do paciente, especialmente em pacientes infectados pelo HIV, onde a doença periodontal aumenta a contagem de *Candida spp*, e por sua vez esta contagem aumentada agrava a doença periodontal. Fator que pode ser explicado pela imunossupressão causada pela doença, que favorece a instalação de infecções oportunistas fúngicas, em especial pela *Candida spp*, que assume características de patogenicidade nesses indivíduos (Eggimann et al., 2003; Feigal et al., 1991).

Em relação aos marcadores pesquisados, a Lf é uma glicoproteína, que atua na inibição da adesão bacteriana no biofilme dental e na marcação de granulócitos presentes em sítios de infecção (Ozdemir et al., 2009). Pode ser encontrada em diferentes secreções corporais, incluído a saliva, desenvolvendo atividade antiviral, antibacteriana e antifúngica (Lourenço et al., 2014). A Lf promove o sequestro de íons de ferro no local da infecção, privando as bactérias desse nutriente, onde interrompe seu crescimento. O presente estudo mediu a dosagem de lactoferrina salivar encontrou no decorrer do tratamento periodontal de todos os indivíduos.

No início do tratamento observamos que a concentração de lactoferrina salivar entre os grupos são semelhantes. O grupo HIV + apresentou a maior queda na concentração de lactoferrina após 30 dias de tratamento (T1), depois desse período a diminuição da concentração de Lf não foi considerável. O declínio da Lf no grupo não HIV no mesmo período avaliado foi mínimo, quando comparado ao grupo HIV+. Podemos relacionar que a queda da profundidade de sondagem no T1 nos indivíduos HIV+, reduziu da inflamação gengival e conseqüentemente diminui a concentração da lactoferrina salivar nesses pacientes durante esse período.

Um outro achado importante na correlação da lactoferrina com o nível clínico de inserção, quanto maior a diferença da Lf no tempo de tratamento, maior a queda do NIC, ou seja, a produção maior da Lf pode levar a melhora da doença periodontal diminuindo a perda de inserção. A Lf não é sintetizada em tecidos gengivais saudáveis, estando associada a tecidos inflamados com presença de células inflamatórias, e, portanto, pode ser considerada um excelente marcador da doença

periodontal, já que é secretada por neutrófilos em resposta à condição inflamatória local (Wakabayashi et al., 2010).

Nossos resultados foram divergentes ao encontrados por Lin et al. (2001), que verificaram maiores concentrações de Lf na saliva de participantes infectados pelo HIV, segundo esse estudo, a concentração de Lf na saliva de participantes infectados pelo HIV estiveram aumentadas em 40% em relação aos participantes não infectados pelo HIV. No entanto, mesmo que o presente estudo não tenha encontrado uma correlação positiva entre as concentrações salivares de Lf e o estado sorológico dos sujeitos ou o uso de TARV, houve correlação positiva entre os níveis de Lf e a condição periodontal.

A histatina é uma classe de peptídeos antimicrobianos com poderosa ação antifúngica principalmente contra o a espécie *C. Albicans* e inibem a formação do biofilme que dá origem a patologias na cavidade oral (Hicks et al., 2003). No presente trabalho, as concentrações de histatina salivares no grupo HIV+ aumentam sutilmente com o tempo, enquanto o grupo não HIV diminui as concentrações de histatina, especialmente no primeiro tempo.

Quando relacionamos as concentrações de histatina com a contagem de *Candida*, o grupo HIV + aumenta a concentração de histatina para quem possui *Candida albicans*, porém diminui para quem tem *Candida* não *albicans*. Podemos verificar que o tratamento periodontal diminui a quantidade de *Candida spp*, por isso a quantidade de histatina salivar aumenta nesses indivíduos. Já no grupo não HIV, observamos diminuição da histatina com o tempo, tanto para quem possui *Candida* não *albicans* e *Candida albicans*, e ao final do tratamento periodontal nesse mesmo grupo a *Candida* não *albicans* desaparece.

7 CONCLUSÃO

Estes resultados sugerem a associação entre a presença de *Candida spp* e a periodontite crônica. Embora não tenha havido mudanças significativas na contagem oral de *Candida spp* após o tratamento periodontal, os pacientes apresentaram melhora nos parâmetros clínicos da doença periodontal. A presença de espécies do gênero *C. albicans* na cavidade oral, eleva a quantidade de histatina salivar, por esse motivo concentração do peptídeo foi maior no grupo HIV+. A lactoferrina salivar pode ser um marcador da periodontite crônica, tanto em pacientes não-infectados, quanto infectados pelo HIV.

REFERÊNCIAS¹

Alpagot T, Duzgunes N, Wolff LF, Lee A. Risk factors for periodontitis in HIV patients. *J Periodontal Res.* 2004 Jun;39(3):149-57.

Alpagot T, Konopka K, Bhattacharyya M, Gebremedhin S, Duzgunes N. The association between gingival crevicular fluid TGF-beta1 levels and periodontal status in HIV-1(+) patients. *J Periodontol.* 2008 Jan;79(1):123-30.

Armitage GC, Jeffcoat MK, Chadwick DE, Taggart EJ, Numabe Y, Landis JR, et al. Longitudinal evaluation of elastase as a marker for the progression of periodontitis. *J Periodontol.* 1994 Feb;65(2):120-8.

Avila M, Ojcius DM, Yilmaz O. The oral microbiota: living with a permanent guest. *DNA Cell Biol.* 2009 Aug;28(8):405-11.

Baqui AA, Meiller TF, Jabra-Rizk MA, Zhang M, Kelley JI, Falkler WA Jr. 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.* 2000 Apr;15(2):67-73.

Barr C, Lopez MR, Rua-Dobles A. Periodontal changes by HIV serostatus in a cohort of homosexual and bisexual men. *J Clin Periodontol.* 1992 Nov;19(10):794-801.

Berberi A, Aoun G. Oral lesions associated with human immunodeficiency virus in 75 adult patients: a clinical study. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg.* 2017 Dec;43(6):388-94.

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.* 2015 Jan;7(1):18-21.

Bierne H, Hamon M, Cossart P. Epigenetics and bacterial infections. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Dec;2(12):a010272.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Boyce BF, Li P, Yao Z, Zhang Q, Badell IR, Schwarz EM, et al. TNF-alpha and pathologic bone resorption. *Keio J Med*. 2005 Sep;54(3):127-31.

Brasil. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/AIDS e das Hepatites Virais. Boletim Epidemiol HIV/AIDS. 2017;22 [citado 23 jan. 2018]. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2017/boletim-epidemiologico-hiv aids-2017>.

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 Aug;48(4):428-32.

Cembranelli SB, Souto FO, Ferreira-Paim K, Richinho TT, Nunes PL, Nascentes GA, et al. First evidence of genetic intraspecific variability and occurrence of *Entamoeba gingivalis* in HIV(+)/AIDS. *PLoS One*. 2013 Dec;8(12):e82864.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Self-reported HIV-antibody testing among persons with selected risk behaviors--southern Los Angeles County, 1991-1992. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1993 Oct 15;42(40):786-9.

Classification and diagnostic criteria for oral lesions in HIV infection. EC-Clearinghouse on Oral Problems Related to HIV Infection and WHO Collaborating Centre on Oral Manifestations of the Immunodeficiency Virus. *J Oral Pathol Med*. 1993 Aug;22(7):289-91.

Costa CR, Cohen AJ, Fernandes OF, Miranda KC, Passos XS, Souza LK, et al. Asymptomatic oral carriage of *Candida* species in HIV-infected patients in the highly active antiretroviral therapy era. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2006a Sep-Oct;48(5):257-61.

Costa CR, Lemos JA, Passos XS, Araujo CR, Cohen AJ, Souza LK, et al. Species distribution and antifungal susceptibility profile of oral *Candida* isolates from HIV-infected patients in the antiretroviral therapy era. *Mycopathologia*. 2006b Jul;162(1):45-50.

Costa PP, Trevisan GL, Macedo GO, Palioto DB, Souza SL, Grisi MF, et al. Salivary interleukin-6, matrix metalloproteinase-8, and osteoprotegerin in patients with periodontitis and diabetes. *J Periodontol*. 2010 Mar;81(3):384-91.

Cross DL, Smith GL. Comparison of periodontal disease in HIV seropositive subjects and controls (II). Microbiology, immunology and predictors of disease progression. *J Clin Periodontol*. 1995 Jul;22(7):569-77.

Dang AT, Cotton S, Sankaran-Walters S, Li CS, Lee CY, Dandekar S, et al. Evidence of an increased pathogenic footprint in the lingual microbiome of untreated HIV infected patients. *BMC Microbiol*. 2012 Jul;12:153.

Delgado AC, de Jesus Pedro R, Aoki FH, Resende MR, Trabasso P, Colombo AL, 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 Apr;15(4):364-71.

de Lima CL, Acevedo AC, Grisi DC, Taba M Jr, Guerra E, De Luca Canto G. Host-derived salivary biomarkers in diagnosing periodontal disease: systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol*. 2016 Jun;43(6):492-502.

Devine DA. Antimicrobial peptides in defence of the oral and respiratory tracts. *Mol Immunol*. 2003 Nov;40(7):431-43.

Drinkard CR, Decher L, Little JW, Rhame FS, Balfour HH, Rhodus NL, et al. Periodontal status of individuals in early stages of human immunodeficiency virus infection. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1991 Oct;19(5):281-5.

Edgerton M, Koshlukova SE, Araujo MW, Patel RC, Dong J, Bruenn JA. Salivary histatin 5 and human neutrophil defensin 1 kill *Candida albicans* via shared pathways. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Dec;44(12):3310-6.

Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis*. 2003 Nov;3(11):685-702.

Feigal DW, Katz MH, Greenspan D, Westenhouse J, Winkelstein W JR, Lang W, et al. The prevalence of oral lesions in HIV-infected homosexual and bisexual men: three San Francisco epidemiological cohorts. *AIDS* 1991 May;5(5):519-25.

Figueredo CM, Rescala B, Teles RP, Teles FP, Fischer RG, Haffajee AD, et al. Increased interleukin-18 in gingival crevicular fluid from periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol*. 2008 Apr;23(2):173-6.

Fong IW, Laurel M, Burford-Mason A. Asymptomatic oral carriage of candida albicans in patients with HIV infection. Clin Invest Med. 1997 Apr;20(2):85-93.

Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. Arthritis Res Ther. 2006; 8 Suppl 2: S3.

Glick M, Muzyka BC, Salkin LM, Lurie D. Necrotizing ulcerative periodontitis: a marker for immune deterioration and a predictor for the diagnosis of AIDS. J Periodontol. 1994 May;65(5):393-7.

Gonçalves LS, Ferreira SM, Silva A, 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 Jun;76(6):915-22.

Gonçalves LS, Ferreira SM, Souza CO, Souto R, Colombo AP. Clinical and microbiological profiles of human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive Brazilians undergoing highly active antiretroviral therapy and HIV-seronegative Brazilians with chronic periodontitis. J Periodontol. 2007 Jan;78(1):87-96.

Gonzalez-Chavez SA, Arevalo-Gallegos S, Rascon-Cruz Q. Lactoferrin: structure, function and applications. Int J Antimicrob Agents. 2009 Apr;33(4):301.e1-8.

Groot F, Geijtenbeek TB, Sanders RW, Baldwin CE, Sanchez-Hernandez M, Floris R, et al. Lactoferrin prevents dendritic cell-mediated human immunodeficiency virus type 1 transmission by blocking the DC-SIGN--gp120 interaction. J Virol. 2005 Mar;79(5):3009-15.

Hicks J, Garcia-Godoy F, Flaitz C. Biological factors in dental caries: role of saliva and dental plaque in the dynamic process of demineralization and remineralization (part 1). J Clin Pediatric Dent. 2003 Fall;28(1):47-52.

Holmstrup P, Glick M. Treatment of periodontal disease in the immunodeficient patient. Periodontol 2000. 2002;28:190-205.

Hung CC, Yang YL, Lauderdale TL, McDonald LC, Hsiao CF, Cheng HH, et al. Colonization of human immunodeficiency virus-infected outpatients in Taiwan with Candida species. J Clin Microbiol. 2005 Apr;43(4):1600-3.

Jainkittivong A, Johnson DA, Yeh CK. The relationship between salivary histatin levels and oral yeast carriage. *Oral Microbiol Immunol*. 1998 Jun;13(3):181-7.

Jang WS, Bajwa JS, Sun JN, Edgerton M. Salivary histatin 5 internalization by translocation, but not endocytosis, is required for fungicidal activity in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*. 2010 Jul;77(2):354-70.

Ji S, Choi YS, Choi Y. Bacterial invasion and persistence: critical events in the pathogenesis of periodontitis. *J Periodontal Res*. 2015 Oct;50(5):570-85.

Kamtane S, Subramaniam A, Survarna P. A comparative study of oral candidal carriage and its association with CD4 count between HIV-positive and healthy individuals. *J Int Assoc Provid AIDS Care*. 2013 Jan-Feb;12(1):39-43.

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 Mar;115(3):534-41.

Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Jun;3:17038.

Koshlukova SE, Lloyd TL, Araujo MW, Edgerton M. Salivary histatin 5 induces non-lytic release of ATP from *Candida albicans* leading to cell death. *J Biol Chem*. 1999 Jul;274(27):18872-9.

Lamster IB, Holmes LG, Gross KB, Oshrain RL, Cohen DW, Rose LF, et al. The relationship of beta-glucuronidase activity in crevicular fluid to clinical parameters of periodontal disease. Findings from a multicenter study. *J Clin Periodontol*. 1994 Feb;21(2):118-27.

Lin AL, Johnson DA, Patterson TF, Wu Y, Lu DL, Shi Q, et al. Salivary anticandidal activity and saliva composition in an HIV infected cohort. *Oral Microbiol Immunol*. 2001 Oct;16(5):270-8.

Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral*. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.

Lourenço AG, Figueiredo LT. Oral lesions in HIV infected individuals from Ribeirão Preto, Brazil. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008 May;13(5):E281-6.

Lourenço AG, Komesu MC, Machado AA, Bourlet T, Pozzetto B, Delezay O. Potential contribution of saliva to the sexual transmission of HIV through the secretion of CCL20 by genital epithelial cells. *J Med Virol*. 2014 Jan;86(1):58-63.

Lourenço AG, Nakao C, Machado AA, Motta AC, Tonani L, Candido RC, et al. Lactoferrin, a marker for periodontal disease. *Curr HIV Res*. 2013 Apr;11(3):220-5.

Lourenço AG, Ribeiro A, Nakao C, Motta ACF, Antonio LGL, Machado AA, et al. Oral *Candida* spp carriage and periodontal diseases in HIV-infected patients in Ribeirão Preto, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2017 Jun;59:e29.

Mataftsi M, Skoura L, Sakellari D. HIV infection and periodontal diseases: an overview of the post-HAART era. *Oral Dis*. 2011 Jan;17(1):13-25.

McKaig RG, Thomas JC, Patton LL, Strauss RP, Slade GD, Beck JD. Prevalence of HIV-associated periodontitis and chronic periodontitis in a southeastern US study group. *J Public Health Dent*. 1998 Fall;58(4):294-300.

Melino S, Santone C, Di Nardo P, Sarkar B. Histatins: salivary peptides with copper(II)- and zinc(II)-binding motifs: perspectives for biomedical applications. *FEBS J*. 2014 Feb;281(3):657-72.

Miller CS, Foley JD, Bailey AL, Campell CL, Humphries RL, Christodoulides N, Floriano PN, Simmons G, Bhagwandin B, Jacobson JW, Redding SW, Ebersole JL, McDevitt JT. Current developments in salivary diagnostics. *Biomark Med*. 2010 Feb;4(1):171-89.

Nery EO, Gonçalves CR, Shimizu MT, Unterkircher CS, Fantinato V, Jorge AOC. Influência dos antígenos do sistema ABO (H) na saliva sobre a presença do gênero *Candida* na cavidade bucal. *Rev Odontol. Univ São Paulo*. 1994; 8: 37-41.

Nittayananta W, Kemapunmanus M, Amornthatree K, Talungchit S, Sriplung H. Oral human beta-defensin 2 in HIV-infected subjects with long-term use of antiretroviral therapy. *J Oral Pathol Med*. 2013 Jan;42(1):53-60.

Noguera-Julian M, Guillen Y, Peterson J, Reznik D, Harris EV, Joseph SJ, et al. Oral microbiome in HIV-associated periodontitis. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Mar;96(12):e5821.

Ozçaka O, Nalbantsoy A, Buduneli N. Interleukin-17 and interleukin-18 levels in saliva and plasma of patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* 2011 Oct;46(5):592-8.

Ozdemir B, Ozcan G, Karaduman B, et al. Lactoferrin in Gingival Crevicular Fluid and Peripheral Blood during Experimental Gingivitis. *Eur J Dent.* 2009 Jan;3(1):16-23.

Pereira VT, Pavan P, Souza RC, Souto R, Vettore MV, Torres SR, 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 May;85(5):697-705.

Peters BA, Wu J, Hayes RB, Ahn J. The oral fungal mycobiome: characteristics and relation to periodontitis in a pilot study. *BMC Microbiol.* 2017 Jul;17(1):157.

Riley C, London JP, Burmeister JA. Periodontal health in 200 HIV-positive patients. *J Oral Pathol Med.* 1992 Mar;21(3):124-7.

Robinson PG. The significance and management of periodontal lesions in HIV infection. *Oral Dis.* 2002;8 Suppl 2:91-7.

Robinson PG, Sheiham A, Challacombe SJ, Zakrzewska JM. The periodontal health of homosexual men with HIV infection: a controlled study. *Oral Dis.* 1996 Mar;2(1):45-52.

Salvi GE, Lawrence HP, Offenbacher S, Beck JD. Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000.* 1997 Jun;14:173-201.

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 Aug;15(7):386-8.

Saunus JM, Kazoullis A, Farah CS. Cellular and molecular mechanisms of resistance to oral *Candida albicans* infections. *Front Biosci.* 2008 May;13:5345-58.

Schenkels LC, Veerman EC, Nieuw AV. Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1995;6(2):161-75.

SINAN. Sistema de Informação de Agravos e Notificações, 2018. [citado 2 fev.. 2017]. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203>.

Teles RP, Likhari V, Socransky SS, Haffajee AD. Salivary cytokine levels in subjects with chronic periodontitis and in periodontally healthy individuals: a cross-sectional study. *J Periodontal Res.* 2009 Jun;44(3):411-7.

Van Dyke TE, Serhan N. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *J Dent Res.* 2003 Feb;82(2):82-90.

Vernon LT, Demko CA, Whalen CC, Lederman MM, Toossi Z, Wu M, et al. Characterizing traditionally defined periodontal disease in HIV+ adults. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2009 Oct;37(5):427-37.

UNAIDS. Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS. 2017. [citado 2 fev. 2017]. Disponível em: https://unaid.org.br/wp-content/uploads/2017/12/UNAIDSBR_FactSheet.pdf. Acesso em: 02/02/2017.

Wakabayashi H, Kondo I, Kobayashi T, Yamauchi K, Toida T, Iwatsuki K, et al. Periodontitis, periodontopathic bacteria and lactoferrin. *Biometals.* 2010 Jun;(23):419-24.

Winkler JR, Robertson PB. Periodontal disease associated with HIV infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1992 Feb;73(2):145-50.

Zhang F, He S, Jin J, Dong G, Wu H. Exploring salivary microbiota in AIDS patients with different periodontal statuses using 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015 Jul;5:55.

ANEXO A – Parecer comitê de ética e pesquisa

Ribeirão Preto, 15 de maio de 2017.

Ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto.

Substituição de pesquisador responsável

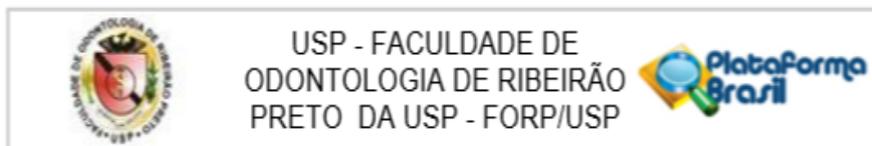
Solicito que a pós-graduanda Tábata Larissa Santos Pólvora me substitua como pesquisador responsável no projeto intitulado “Determinação de fatores envolvidos na patogênese da doença periodontal em pacientes infectados pelo HIV” CAAE: 50004415.1.0000.5419.

Atualmente, este projeto é tema de mestrado da referida pós-graduanda. E por uma exigência da Pós-Graduação em Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FO-USP), na qual ela está matriculada, se faz necessário que ela seja a responsável pelo projeto mediante ao Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto.

No aguardo de uma resposta favorável, envio saudações cordiais.



Alan Grupioni Lourenço
Pesquisador responsável.



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.



USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO DA USP - FORP/USP



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: 14.040-504
UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3315-0493 Fax: (16)3315-4102 E-mail: cep@forp.usp.br

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

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

Nós, Alan Grupioni Lourenço, Atila Vinicius Vitor Nobre, Leticia Richard Miranda Silva, Tábata Larissa Santos Pólvora, 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 das 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: **Alan Grupioni Lourenço, Atila Vinicius Vitor Nobre, Leticia Richard Miranda Silva, Tábata Larissa Santos Pólvora, 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 pelos 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.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

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: **Alan Grupioni Lourenço, Atila Vinicius Vitor Nobre, Leticia Richard Miranda Silva, Tábata Larissa Santos Pólvora, 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

Atila Vinicius Vitor Nobre
CPF: 030.039.723-24; Tel: 88-996770550
Pesquisadora participante

Tábata Larissa Santos Pólvora
CPF: 111.760.767-44; Tel: 27-992798387
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)

R.G: _____ Telefone: _____



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

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

Nós, Alan Grupioni Lourenço, Atila Vinicius Vitor Nobre, Leticia Richard Miranda Silva, Tábata Larissa Santos Pólvora, 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 das 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: Alan Grupioni Lourenço, Atila Vinicius Vitor Nobre, Leticia Richard Miranda Silva, Tábata Larissa Santos Pólvora, 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 pelos 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



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

familiares ou outras pessoas de sua confiança para avaliar se deseja ou não participar da pesquisa.

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

Atila Vinicius Vitor Nobre
CPF: 030.039.723-24; Tel: 88-996770550
Pesquisadora participante

Tábata Larissa Santos Pólvara
CPF: 111.760.767-44; Tel: 27-992798387
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 – Protocolo de investigação clínica



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:

<input type="checkbox"/> Pneumonia por <i>Pneumocystis carinii</i>	<input type="checkbox"/> Candidíase.
<input type="checkbox"/> Criptococose	<input type="checkbox"/> Histoplasmose
<input type="checkbox"/> Tuberculose	<input type="checkbox"/> Micobacteriose atípica
<input type="checkbox"/> Doença periodontal	<input type="checkbox"/> Úlceras aftóides
<input type="checkbox"/> Infecção por Citomegalovírus	<input type="checkbox"/> Herpes simples
<input type="checkbox"/> Herpes Zoster	<input type="checkbox"/> Toxoplasmose
<input type="checkbox"/> Estrongiloidiase 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 Implantantes.
26. Existe alguma informação importante que não foi perguntada?
27. Observações: _____

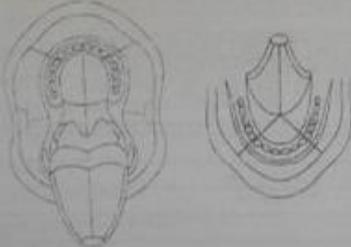
ANEXO D – Ficha de avaliação física e exame intrabucal

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: _____

ANEXO E – Periograma

Nome: _____ Prontuário Nº _____

Estado atual em: ____/____/____

	Inicial	Reavaliação	Final
JCE - MG			
PS-SS			
NCI			
Vestibular			
Palatina			
JCE - MG			
PS-SS			
NCI			
Lingual			
Vestibular			
JCE - MG			
PS-SS			
NCI			

SS = ____%