



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PRISCILA PEREIRA PAVAN VIDAL

**ASSOCIAÇÃO ENTRE A CARGA VIRAL PLASMÁTICA E A CARGA
VIRAL SUBGENGIVAL NO BIOFILME EM PACIENTES INFECTADOS PELO
HIV-1**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM PERIODONTIA

RIO DE JANEIRO

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Priscila Pereira Pavan Vidal

**ASSOCIAÇÃO ENTRE A CARGA VIRAL PLASMÁTICA E A CARGA
VIRAL SUBGENGIVAL NO BIOFILME EM PACIENTES INFECTADOS PELO
HIV-1**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Odontologia
(Mestrado), Faculdade de Odontologia da
U.F.R.J. como parte dos requisitos necessários
à obtenção do título de Mestre em
Odontologia, área de concentração em
Periodontia.

Orientadores: Dr. Carmelo Sansone
Dr. Lúcio de Souza Gonçalves

Co-orientadora: Dra. Luciana Costa

Abril/Rio de Janeiro

2013

**ASSOCIAÇÃO ENTRE A CARGA VIRAL PLASMÁTICA E A CARGA
VIRAL SUBGENGIVAL NO BIOFILME EM PACIENTES INFECTADOS PELO
HIV-1**

Priscila Pereira Pavan Vidal

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Odontologia (Mestrado), Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração em Periodontia.

Rio de Janeiro, ____ de _____ de ____.

Aprovada por:

Carmelo Sansone

Doutor (Presidente da Banca Examinadora)

Professor Adjunto da Faculdade de Odontologia – Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Ana Paula Vieira Colombo

Doutora (Membro da Banca Examinadora)

Professora Adjunta do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes – Universidade Federal do Rio de Janeiro – IMPPG/UFRJ

Ricardo Guimarães Fischer

Doutor (Membro da Banca Examinadora)

Professor Titular da Faculdade de Odontologia – Universidade Estadual do Rio de Janeiro – UERJ

FICHA CATALOGRÁFICA

PAVAN VIDAL, Priscila Pereira

Associação entre a carga viral plasmática e a carga viral subgengival no biofilme em pacientes infectados pelo HIV-1 / Priscila Pereira Pavan Vidal - Rio de Janeiro: UFRJ/ Faculdade de Odontologia, 2013.

xvii, 60., il.; 29,7cm.

Orientadores: Carmelo Sansone e Lúcio de Souza Gonçalves

Dissertação (Mestrado) – UFRJ/ Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-graduação em Odontologia (Periodontia), 2013.

Referências bibliográficas: f. 37-47.

1. Infecção pelo HIV 2. Carga viral plasmática 3. Biofilme subgengival 4. PCR em Tempo Real. I. Sansone, Carmelo. II. UFRJ, Faculdade de Odontologia, Mestrado em Odontologia (Periodontia). III. Título

“Ela acreditava em anjo e, porque acreditava, eles existiam.”

Clarice Lispector

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que mais amo, especialmente:

Ao meu querido marido, Raphael, por ser meu grande companheiro, por me apoiar em tudo e a quem eu admiro e amo cada dia mais.

À minha mãe, Angela, por ser meu maior exemplo de amor incondicional, força e dedicação. Obrigada por me ensinar a lutar pelos meus sonhos.

Ao meu pai, Vicente, pelo carinho, amor e por ter me mostrado o valor dos estudos.

À minha avó, Yedda, por todo afeto e apoio.

Às minhas irmãs Leticia, Alice, Ingrid e Cynthia pela amizade, cumplicidade e alegria sempre presentes.

Ao meu amado afilhado, Pedro, que me alegra com um simples sorriso.

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar o meu caminho sempre.

A todos os meus familiares e amigos que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e confortando.

Ao meu orientador, Prof. Lúcio de Souza Gonçalves, pelo incentivo à minha participação em pesquisa desde a especialização, pelos ensinamentos e exemplo de caráter. A você minha eterna gratidão.

Ao meu orientador, Prof. Carmelo Sansone, por todo o apoio dado durante o curso de mestrado.

À minha co-orientadora, Prof^a. Luciana Costa, por ter me acolhido tão bem em seu laboratório e por todo apoio e ajuda fundamentais neste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, por todas as críticas, sugestões e contribuições para este trabalho.

À Prof^a. Ana Paula Colombo, pelo estímulo e incentivo à minha participação no IADR durante o mestrado.

Aos demais professores do programa de Pós-graduação em periodontia da Faculdade de odontologia da UFRJ: Eduardo, Cynésia e Anna Thereza. Obrigada por todos os ensinamentos!

Aos amigos Viviane Tiago e Rodrigo Carvalho pela grande participação neste trabalho. Sentirei saudade dos bons momentos compartilhados ao longo dessa jornada.

Às amigas de turma Clarisse e Gabriela por todos os momentos divertidos e difíceis durante o curso.

Aos amigos e colegas do curso pela convivência e momentos de descontração.

Aos alunos do laboratório de virologia por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Odontológica pela boa vontade sempre presente.

Aos pacientes que fizeram parte desse trabalho pela grande contribuição e por me fazerem estudar sempre.

A CAPES pelo suporte financeiro ao longo do curso.

RESUMO

ASSOCIAÇÃO ENTRE A CARGA VIRAL PLASMÁTICA E A CARGA VIRAL SUBGENGIVAL NO BIOFILME EM PACIENTES INFECTADOS PELO HIV-1

Priscila Pereira Pavan Vidal

Orientadores: Prof. Dr. Carmelo Sansone
Prof. Dr. Lúcio Gonçalves

Co-orientadora: Dra. Luciana Costa

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Periodontia), Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Odontologia (Periodontia).

Objetivo: Investigar a associação entre carga viral no biofilme subgengival (CVS) e carga viral plasmática (CVP) do HIV-1 e os parâmetros clínicos periodontais em indivíduos infectados pelo HIV. **Metodologia:** Quarenta e um pacientes com sorologia positiva para HIV-1 foram distribuídos em dois grupos: 20 com CVP detectável e 21 com CVP indetectável (< 50 cópias/mL). Amostras do biofilme subgengival foram coletadas de 12 sítios de cada paciente com periodontite, sendo 6 sítios com as maiores PBS, preferencialmente não adjacentes, e 6 sítios com periodonto sadio. Nos pacientes com saúde periodontal, foram coletadas 6 amostras de sítios periodontais sadios aleatórios. Das 6 amostras dos sítios com maiores PBS dos pacientes com periodontite, foram realizados 3 *pools*, com 2 amostras cada, de sítios com parâmetros clínicos semelhantes. O mesmo foi feito para as 6 amostras de periodontos sadios (tanto para os pacientes com periodontite como para aqueles com saúde periodontal), resultando em 3 *pools*. A detecção e

quantificação da CVS foram realizadas através do PCR em Tempo Real. Os níveis de linfócitos T CD4+, T CD8+, neutrófilos e CVP foram obtidos dos resultados desses exames presentes nos prontuários médicos de cada paciente. Diferenças significativas entre os grupos para todos os parâmetros estudados foram avaliadas pelos testes Qui-quadrado, exato de Fisher e Mann-Whitney. O modelo de regressão utilizado foi a Equação de Estimação Generalizada (GEE) para testar a associação entre as co-variáveis e a CVS. **Resultados:** A maioria dos indivíduos era composta por homens (51,2%), não usuários de drogas (85,4%), não tabagistas (63,4%) e não consumidores diários de álcool (87,8%). Os dados laboratoriais demonstraram diferenças significantes entre os dois grupos estudados somente para os níveis de linfócitos T CD4+ ($p = 0,038$), porém não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação aos parâmetros clínicos periodontais. Não houve associação estatisticamente significativa entre CV plasmática e CV subgengival, sendo a contagem de linfócitos TCD4+ a única co-variável que apresentou efeito estatisticamente significativo sobre o desfecho CV subgengival indetectável ($p = 0,017$). A interpretação dos resultados demonstrou que indivíduos com níveis mais altos de linfócitos T CD4+ (> 500 células/mm³) tem uma chance muito maior de apresentar CV subgengival indetectável em relação aos indivíduos com níveis de linfócito T CD4+ < 200 células/mm³. **Conclusão:** Não há associação entre a carga viral no biofilme subgengival e a carga viral plasmática do HIV-1 e os parâmetros clínicos periodontais em pacientes infectados pelo HIV.

Palavras - chave: infecção pelo HIV-1; biofilme subgengival; carga viral plasmática

ABSTRACT

ASSOCIATION BETWEEN PLASMATIC VIRAL LOAD AND SUBGINGIVAL VIRAL LOAD IN BIOFILM IN HIV-1 INFECTED PATIENTS.

Priscila Pereira Pavan Vidal

Mentors: Prof. Dr. Carmelo Sansone

Prof. Dr. Lúcio Gonçalves

Abstract of dissertation submitted to the Postgraduate Program in Dentistry (Periodontics), School of Dentistry, Federal University of Rio de Janeiro, as part of the requirements for obtaining the title of Master of Dentistry (Periodontics).

Aim: To investigate the association between subgingival viral load in biofilm and plasmatic viral load and clinical periodontal parameters in HIV-1 infected patients. **Methods:** Forty-one HIV-positive patients were divided into two groups: detectable and undetectable plasmatic viral load (< 50 copies/mL). Subgingival biofilm samples were collected from 12 sites in each patient with periodontitis, 6 sites with the deepest PBS, preferably not adjacent, and 6 sites with healthy periodontium. In patients with periodontal health, 6 samples were collected from random healthy periodontal sites. Of the six samples of periodontal lesions were performed 3 pools, with 2 samples from each site with similar clinical parameters. The same was done with the 6 samples from healthy periodontium, resulting in three pools. Detection and quantification of subgingival viral load were determined by Real Time PCR. The levels of CD4, CD8, neutrophils and plasmatic viral load were obtained from the

medical records of each patient. Significant differences between groups for all parameters were evaluated by Chi-square, Fisher's exact test and Mann-Whitney. The utilized regression model consisted of a test called Generalized Estimation Equation (GEE) to test the association between the co-variables and the subgingival viral load. **Results:** The majority of the patients were male (51,2%), non-drug users (85,4%), non-smokers (63,4%) and non-alcohol users (87,8%). The laboratory data demonstrated significant differences between groups only for levels of TCD4+ cells ($p=0,038$), however there was no significant difference between groups for clinical periodontal parameters. There was no statistically significant association between plasmatic viral load and subgingival viral load, and only the levels of TCD4+ cells demonstrated significant effect on the undetectable subgingival viral load ($p=0,017$). The interpretation of the results demonstrated that patients with higher levels of TCD4+ cells ($> 500 \text{ cells/mm}^3$) have a much higher chance of presenting undetectable subgingival viral load compared to patients with levels of TCD4+ cells $< 200 \text{ cells/mm}^3$. **Conclusion:** There is no association between subgingival viral load in biofilm and plasmatic viral load and clinical periodontal parameters in HIV-1 infected patients.

Keywords: HIV-1 infection; subgingival biofilm; plasmatic viral load

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xv
LISTA DE FIGURAS.....	xvii
1- INTRODUÇÃO.....	1
2- OBJETIVO.....	8
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
3.1- Seleção de pacientes.....	9
3.2- Exame clínico periodontal.....	9
3.3- Detecção do HIV-1 no biofilme subgengival.....	10
3.3.1- Coleta de amostras para detecção do HIV.....	10
3.3.2- Extração do RNA viral.....	11
3.3.3- Reação de cDNA.....	13
3.3.4- Identificação do HIV pela técnica da PCR em tempo real.....	13
3.3.4.1- TaqMan.....	14
3.3.4.2- SYBR® Green.....	15
3.3.4.3- Curva Padrão.....	15
3.4- Análise imunológica.....	16
3.4.1- Análise do sangue periférico.....	16
3.5- Análise estatística.....	16
4- RESULTADOS.....	18
4.1- Características socio-demográficas, de comportamentos relacionados à saúde, clínicas e laboratoriais dos pacientes estudados.....	18
5- DISCUSSÃO.....	30
6- CONCLUSÃO.....	36
7- REFERÊNCIAS.....	37
8- ANEXOS.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius/ <i>Celsius degree</i>
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CMV	Citomegalovírus
CV	Carga viral
CVP	Carga viral plasmática
CVS	Carga viral subgengival
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> /Ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxiribonucleotídeo trifosfato
DP	Desvio-padrão
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> /ácido etilenodiamino tetraacético
GEE	Equação de Estimação Generalizada
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IC	Intervalo de Confiança
IP	Índice de Placa
IP*	Inibidor da Protease
ITRAN	Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeos
ITRNN	Inibidores de Transcriptase Reversa Não-análogo de Nucleosídeos
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro

NIC	Nível de Inserção Clínico
P	Probabilidade
PBS	Profundidade de bolsa à sondagem
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
RC	Razão de chance
rpm	Rotação por minuto
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> /Ácido ribonucleico
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SS	Sangramento à sondagem
T CD4+	Linfócitos T CD4+
TARV	Terapia Antirretroviral Combinada
TCD8+	Linfócito TCD8+
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	Tampão tris-EDTA
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UNAIDS	<i>Joint United Programme on HIV/AIDS</i>
β	Erro Beta
μL	Microlitro
μM	Micromolar

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características socio-demográficas e de comportamentos relacionados à saúde dos 41 pacientes estudados.....	19
Tabela 2. Doenças passadas ou recentes dos 41 pacientes infectados pelo HIV estudados.....	20
Tabela 3. Frequência do uso de antiretroviral, TARV e sulfametoxazol+trimetoprima pelos 41 pacientes estudados.....	21
Tabela 4. Comparação dos dados laboratoriais entre os grupos carga viral plasmática (CVP) detectável e indetectável.....	22
Tabela 5. Comparação das características socio-demográficas e do comportamento relacionado à saúde entre os grupos carga viral plasmática (CVP) detectável e indetectável	23
Tabela 6 . Comparação das características relacionadas à infecção pelo HIV entre os grupos carga viral plasmática (CVP) detectável e indetectável.....	24
Tabela 7. Comparação descritiva entre a CV plasmática e a CV subgengival para cada paciente do grupo CV detectável.....	25
Tabela 8. Comparação dos parâmetros periodontais entre os grupos carga viral plasmática (CVP) detectável e indetectável.....	26
Tabela 9. Análise bivariada entre as co-variáveis do nível do indivíduo e o desfecho CV subgengival.....	27

Tabela 10. Modelo logístico ajustado utilizando Equação de Estimação Generalizada para estimar o efeito das co-variáveis sobre o desfecho carga viral subgingival indetectável.....	28
--	-----------

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da etapa de extração de RNA viral.....	12
Figura 2. Amplificação da curva padrão realizada no estudo.....	28
Figura 3. Amplificação de amostra de carga viral subgengival.....	29

1-INTRODUÇÃO

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) é uma doença causada pela infecção do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e é tipicamente caracterizada por alterações imunes graves atingindo, particularmente, subpopulações de linfócitos TCD4+ com conseqüente imunossupressão e aparecimento de uma variedade de infecções oportunistas potencialmente fatais (CHERMANN et al., 1983).

Em 2007, 33 milhões de pessoas no mundo estavam infectadas pelo HIV. O modo de transmissão difere entre os países, e inclui contato sexual, compartilhamento de seringas entre usuários de drogas injetáveis, transmissão de mãe para filho (incluindo o leite materno) e outras fontes nosocomiais (COHEN et al., 2008). Globalmente a transmissão do HIV em mulheres é predominante devido ao alto risco do contato sexual, contribuindo para 80% de novas infecções (NAVAZESH et al., 2010).

O HIV tipo 1 e tipo 2 (HIV-1 e HIV-2) são retrovírus. A infecção pelo HIV-1 é a principal causa da AIDS pelo mundo. O HIV-2 também causa a AIDS e está presente principalmente nos países do Oeste da África e em menores proporções em outras regiões com vínculos socioeconômicos históricos como as antigas colônias portuguesas incluindo Angola, Moçambique, Guiné-Bissau, Índia e Brasil. Na Europa e América do Norte, a maioria dos indivíduos infectados pelo HIV-2 era imigrante da África ou menos frequentemente, pessoas que tinham vivido no Oeste da África por um período ou que se relacionaram sexualmente com pessoas desta região (SORIANO et al., 2000).

O HIV-1 pode ser isolado de vários fluidos corporais, excreções e secreções (HADLEY, 1989). Entretanto, evidências epidemiológicas mostram apenas sangue, sêmen, secreção vaginal e cervical, e leite materno como fontes de transmissão do vírus (SCHACKER et al., 1996). O HIV-1 também pode ser encontrado na saliva, fluido do sulco gengival e fluido cerebroespinal (NAVAZESH et al., 2010; SHUGARS et

al.,2001; MATICIC et al.,2000; CINQUE et al.,2002). Apesar de alguns estudos mostrarem a presença do HIV-1 na saliva dos pacientes infectados pelo HIV (GROOPMAN et al., 1984; HO et al., 1985; LEVY AND GREENSPAN, 1988; BARR et al., 1992), raramente a mucosa bucal é considerada uma fonte de transmissão do HIV (MATICIC et al., 2000).

NAVAZESH et al.(2010), demonstraram uma forte associação entre a carga viral plasmática de HIV-1 com a carga viral nas amostras de saliva analisadas de mulheres infectadas pelo HIV. Isso também foi demonstrado em outros estudos (LIUZZI et al.,1996; SHUGARS et al.,2000; SHUGARS et al.,2001) e reforça a idéia de que a saliva possa ser uma fonte útil e não-invasiva para se estimar a carga viral plasmática (SHUGARS et al., 2000). Essa correlação significativa também foi observada entre carga viral plasmática de HIV-1 e carga viral do fluido do sulco gengival no estudo de MATICIC et al (2000).

Em países em desenvolvimento, 24-42% de crianças infectadas pelo HIV-1 adquiriram o vírus durante a amamentação (THE BREASTFEEDING AND HIV INTERNATIONAL TRANSMISSION STUDY GROUP, 2004). A ingestão de 1000 mL de leite materno de uma mãe infectada pelo HIV-1 confere ao bebê um risco de aquisição do HIV da mesma magnitude que contato sexual de um adulto infectado pelo HIV-1 (RICHARDSON et al., 2003). A alta proporção de células infectadas pelo HIV-1 do total de células produtoras de leite está associada com a transmissão do HIV-1 (ROUSSEAU et al., 2004), sugerindo que células T CD4+ infectadas latentes no leite possam contribuir para a transmissão através da amamentação (PETITJEAN et al., 2007).

A complicação neurológica é um dos principais problemas em pacientes infectados pelo HIV, embora a frequência tenha reduzido bastante com a introdução da terapia antirretroviral (TARV). Doenças do sistema nervoso central causadas por vírus

incluem encefalite, meningite, entre outras. Infecções do sistema nervoso central causadas por Citomegalovírus e HIV-1 são bons exemplos em que os métodos quantitativos para detecção do vírus no fluido cerebrospinal podem ser muito úteis (CINQUE et al., 2003). A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um dos métodos que tem sido utilizado para quantificação do RNA do HIV-1 no fluido cerebrospinal (CINQUE et al., 2000).

Tem sido sugerido que a ativação imune crônica associada às co-infecções causadas por patógenos não-HIV (por exemplo *Pneumocystis jiroveci*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Herpesvirus* e *Porphyromonas gingivalis*) (KOZIEL et al., 1999; GOLETTI et al., 1996; CASELLI et al., 2005; GIACAMAN et al., 2007; GIACAMAN et al., 2008) seja um fator crítico que influencia o grau e a progressão da AIDS, além do sucesso/fracasso da terapia antirretroviral. Além disso, algumas citocinas/quimiocinas pro-inflamatórias e mediadores produzidos por células imunes e não-imunes do hospedeiro também podem agir como inibidores ou estimuladores regulando a recrudescência do HIV-1 (COLLMAN et al., 2003; OGUARIRI et al., 2007). Por isso, entender o papel da ativação imune associada às co-infecções não-HIV (incluindo a doença periodontal) na replicação do HIV-1 pode ter importante significância clínica para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o controle da AIDS durante as infecções oportunistas (GONZÁLEZ et al., 2009).

As doenças periodontais são doenças infecto-inflamatórias, de natureza polimicrobiana e multifatorial, que podem resultar na destruição do periodonto de proteção e sustentação e, conseqüentemente, causar a perda dentária. Clinicamente podem ser detectadas pela presença de inflamação gengival, formação de bolsa periodontal e reabsorção óssea alveolar (LINDHE, 1999). A periodontite crônica é a forma mais comum de doença periodontal destrutiva que se caracteriza clinicamente pela

presença e acúmulo de cálculo e biofilme dental, apresenta uma progressão lenta à moderada, com surtos de exacerbação, e acomete principalmente indivíduos com mais de 35 anos de idade. A quantidade de destruição periodontal está diretamente relacionada com a presença de fatores irritantes locais, tais como grau de higiene bucal do paciente, quantidade de biofilme e cálculo dentais, bem como com a presença de fatores de risco associados à suscetibilidade do hospedeiro (LINDHE, 1999).

A doença periodontal tem sido associada com o vírus HIV-1 durante as últimas décadas (BARR et al., 1992; HOLMSTRUP et al., 1994). No estudo realizado por Vernon et al. (2009) o grau e a extensão da doença periodontal em pacientes infectados pelo HIV foram elevados, mesmo a maioria dos pacientes fazendo uso de TARV. Existem relatos inconsistentes da frequência de doença periodontal em pacientes infectados pelo HIV. Há um número de possíveis razões para isso: diferentes definições de doença periodontal (HOLMSTRUP et al., 1994) e diferentes metodologias usadas para mensurar os parâmetros clínicos periodontais (medições parciais versus *full-mouth* e o número de sítios avaliados por dente). Muitos estudos que relataram menor frequência de doença periodontal em pacientes infectados pelo HIV usaram coleta parcial de dados periodontais (ALVES et al., 2006; DRINKARD et al., 1991; FRIEDMAN et al., 1991; SCHEUTZ et al., 1997), subestimando a prevalência da doença periodontal nesta população (PAGE et al., 2007).

Existem evidências crescentes de que o aumento na prevalência e gravidade de uma variedade de doenças orais está associado à imunossupressão com a infecção pelo HIV. Cerca de 40-50% dos pacientes soropositivos para o HIV exibem alguma infecção oral fúngica, bacteriana ou viral (REZNIK, 2005). Estudos clínicos têm demonstrado uma correlação positiva entre carga viral plasmática do HIV-1 e doenças infecciosas orais, como a doença periodontal, leucoplasia pilosa e candidíase (ALPAGOT et al., 2004,

2007; PATTON, 2000; RAMIREZ-AMADOR et al., 2005; BLACK et al., 2000). Entretanto, o potencial para os patógenos orais impactarem os reservatórios das células com HIV e induzirem a reativação do vírus ainda não foi definido (GONZÁLEZ et al., 2009).

O HIV-1 é um vírus RNA (ácido ribonucléico) que pertence à família dos retrovírus, gênero lentivirus. Esse grupo de vírus geralmente precisa produzir o ácido desoxirribonucleico (DNA) a partir do RNA (cDNA) para replicar dentro da célula do hospedeiro, utilizando todo maquinário enzimático que inclui a transcriptase reversa (FREED E MOULAND, 2006).

A infecção é iniciada pelo encontro do HIV-1 com uma célula que expressa a molécula CD4 como receptor. A interação entre a molécula de CD4 e a glicoproteína de superfície viral, gp120, induz uma mudança conformacional nessa glicoproteína gp120, permitindo que ela interaja com os receptores CCR5 ou CXCR4. Essa ligação leva à mudanças conformacionais na gp 41 que resulta na fusão do vírus com a membrana celular, permitindo a entrada do vírus na célula do hospedeiro. No citoplasma da célula do hospedeiro, a transcriptase reversa do HIV-1 converte RNA viral em DNA, e esse novo DNA associado a proteínas do vírus e do hospedeiro transloca-se ao núcleo, onde é integrado ao DNA do hospedeiro através da atividade da enzima viral integrase. O DNA viral que se integrou com o genoma do hospedeiro é conhecido como um provírus. Neste ponto do ciclo viral, o HIV-1 pode manter-se em latência infectando algumas células do hospedeiro. Embora as células T CD4+ pareçam ser os alvos primários do HIV-1, outras células imunes e não-imunes com ou sem molécula CD4 em sua superfície podem ser infectadas. Macrófagos, células dendríticas, células T CD8+, células endoteliais, células epiteliais e fibroblastos também podem abrigar provírus HIV no seu genoma (FREED E MOULAND, 2006).

Latência viral é definida como um estado reversível no qual o genoma viral está presente na célula do hospedeiro sem produção de partículas infecciosas virais, um quadro de sucesso da TARV (GONZÁLEZ et al., 2009). Entretanto, a população de células infectadas latentes em pacientes infectados pelo HIV pode ser refratária à TARV, e mesmo em pacientes que recebem a terapia antirretroviral, a replicação do HIV-1 pode ocorrer, explicando a persistência da infecção, resultando na AIDS (BLANKSON et al., 2002).

Estudos analisando o impacto da vacinação da gripe e tétano em pacientes infectados pelo HIV encontraram um aumento na carga viral que retornou aos níveis pré-vacinação em 3-4 semanas (STAPRANS et al., 1995; STANLEY et al., 1996; O'BRIEN et al., 1995). Essas observações confirmam o que foi relatado anteriormente a respeito da hipótese de que co-infecções em pacientes soropositivos para o HIV podem contribuir para a progressão da doença, um conceito baseado na relação entre infecções microbianas e a evolução clínica da AIDS (GONZÁLEZ et al., 2009).

Estudos prospectivos mostrou uma correlação positiva entre carga viral plasmática do HIV-1 e doença periodontal assim como aumento na presença de prostaglandina E2, metaloproteinase-9 e inibidor de metaloproteinase-1 no fluido gengival crevicular (ALPAGOT et al., 2007, 2006). Além disso, um aumento significativo nos níveis de *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, assim como interferon γ e TGF β no fluido gengival também foram demonstrados, o que podem ser fatores de risco para uma rápida progressão da periodontite em pacientes infectados pelo HIV (ALPAGOT et al., 2003, 2004, 2007, 2008).

O ambiente oral pode ser um local favorável à patogênese do HIV-1 e também um potente reservatório para a doença em pacientes infectados pelo HIV, já que

o RNA viral e o DNA proviral estão presentes na saliva e no fluido do sulco gengival (MATICIC et al., 2000; SHUGARS et al., 2001). Além disso, tem sido demonstrado que as células epiteliais orais e células de Langerhans podem ser reservatórios do HIV-1 na mucosa bucal (SONJA et al., 2009). Entretanto, substâncias que inativam o vírus, carga viral baixa e anticorpos específicos anti-HIV parecem reduzir a infectividade dos virions na saliva (MCNEELY et al., 1995; SHUGARS et al., 1999; KIM et al., 2006).

Na mucosa bucal, mais especificamente nos sítios subgengivais, a presença do HIV-1 pode desempenhar um papel importante na patogênese da doença periodontal em indivíduos soropositivo para o HIV (RYDER, 2002), além do fluido gengival funcionar como um reservatório de partícula viral mesmo na ausência de sangramento gengival, principalmente em indivíduos com infecção pelo HIV avançada (MATICIC et al., 2000). Assim, a infecção dos tecidos periodontais pelo HIV-1 atuaria como um co-fator na doença periodontal destrutiva através de um efeito lítico direto nas células do epitélio gengival (PARRA & SLOTS, 1996; CONTRERAS et al, 1999). Além disso, tem sido sugerido que a ação do HIV-1 no tecido periodontal ocorre pela supressão das células T CD4+ e/ou pela atuação como superantígeno, que pode provocar um desequilíbrio na resposta do hospedeiro (SHIRAI et al, 1992).

2- OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo investigar a associação entre a carga viral no biofilme subgengival (CVS) e a carga viral plasmática (CVP) do HIV-1 e os parâmetros clínicos periodontais em pacientes infectados pelo HIV.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Seleção de pacientes

O presente estudo selecionou, entre 2010 e 2011, os pacientes de um grupo de indivíduos em acompanhamento na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e no Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da UFRJ infectados com sorologia positiva para HIV-1. Todos os pacientes foram informados por escrito dos objetivos do estudo, seus riscos e benefícios e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para a participação no estudo (**Anexo 1**). Em seguida, esses pacientes preencheram um questionário de anamnese, que incluiu dados demográficos e gerais sobre sua saúde e a história da infecção pelo HIV (**Anexo 2**). Todos os pacientes tinham mais de 20 anos de idade e no mínimo 15 dentes, excluindo os terceiros molares. Foram excluídos do estudo pacientes gestantes, lactantes, diabéticos, pacientes internados, pacientes com doenças auto-imunes e doenças periodontais necrosantes, pacientes que faziam uso de aparelho ortodôntico ou que necessitavam de pré-medicação profilática para tratamento dentário. Após todos esses procedimentos, dos 150 pacientes examinados, somente 41 foram incluídos no estudo. Os pacientes foram distribuídos em dois grupos: 20 com CVP detectável (≥ 50 cópias/mL) e 21 com CVP indetectável (< 50 cópias/mL). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da UFRJ (**Anexo 3**).

3.2 - Exame clínico periodontal

Todos os pacientes incluídos no estudo foram submetidos a exame clínico periodontal. As medidas clínicas foram realizadas em 6 sítios por dente (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual, lingual e disto-lingual), em todos os dentes,

exceto os terceiros molares, por um único examinador calibrado (coeficiente de correlação intraclasse igual a 0,96 para PBS e 0,97 para NIC) utilizando uma sonda periodontal milimetrada modelo Carolina do Norte (Hu-Friedy, Chicago, IL, EUA). Os parâmetros avaliados incluíram: sangramento à sondagem (SS) (0/1), índice de placa (IP) (0/1), profundidade de bolsa à sondagem (PBS) e nível de inserção clínico (NIC) em milímetros (**Anexo 4**). O critério de classificação de paciente portador de periodontite crônica considerado foi a presença de pelo menos 4 sítios periodontais com profundidade de bolsa à sondagem (PBS) ≥ 5 mm e/ou nível de inserção clínico (NIC) ≥ 4 mm com SS, em diferentes dentes. Aquele com saúde periodontal deveria apresentar menos de 5% dos sítios com SS, podendo ter PBS ou NIC = 4 mm em até 5% dos sítios sem SS concomitante (desde que essas perdas não envolvessem áreas interproximas), mas sem perdas dentárias por doença periodontal.

3.3 - Detecção do HIV-1 no biofilme subgengival

3.3.1 - Coleta de amostras para detecção do HIV

Utilizando curetas periodontais (Hu-Friedy) estéreis, amostras do biofilme subgengival foram coletadas de 12 sítios de cada paciente com periodontite, sendo 6 sítios com as maiores PBS(> 3mm), preferencialmente não adjacentes, e 6 sítios com periodontos saudáveis. Nos pacientes com saúde periodontal, foram coletadas 6 amostras de sítios periodontais saudáveis aleatórios. Depósitos do biofilme supragengival foram removidos previamente com gaze estéril. Das 6 amostras dos sítios com maiores PBS dos pacientes com periodontite foram realizados 3 *pools*, com 2 amostras cada, de sítios com parâmetros clínicos semelhantes. O mesmo foi feito para as 6 amostras de periodontos saudáveis (tanto para os pacientes com periodontite como para aqueles com saúde periodontal), resultando em 3 *pools*. Cada *pool* de biofilme foi depositado em um

tubo tipo eppendorf estéril contendo 100µl de uma solução tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,6) e armazenadas no freezer (-80°C). Essas amostras foram usadas para detecção e quantificação do HIV no biofilme subgengival pela técnica da PCR em Tempo Real.

3.3.2 - Extração do RNA viral

A metodologia de extração do RNA viral foi realizada utilizando o Mini Kit QIAamp Viral RNA (QIAGEN), conforme instruções do fabricante.

Adicionou-se 560 µl do tampão AVL(adicionado de tRNA carreador) em um tubo tipo eppendorf para que a amostra fosse lisada, inativando as RNases, garantindo assim, o isolamento do RNA viral intacto. O tRNA carreador é adicionado ao tampão AVL para aumentar a probabilidade do RNA viral se ligar a membrana de sílica das colunas. Posteriormente, 100 µl da amostra foram adicionados neste tubo. A mistura foi incubada à temperatura ambiente por 10 minutos. Foram adicionados 560 µl de etanol puro à mistura seguido de centrifugação rápida a 8000 rpm . Os 630 µl da mistura foram aplicados à coluna, centrifugando durante 1 minuto a 8000 rpm. Trocou-se o tubo coletor de cada amostra e o restante foi aplicado à coluna, repetindo-se a centrifugação e a troca do coletor. O RNA viral quando presente fica desta forma ligado à coluna. A fim de remover possíveis contaminantes são realizadas lavagens adicionando-se 500 µl de tampão de lavagem AW1, seguindo centrifugação e troca do coletor, e posteriormente, 500 µl de tampão de lavagem AW2, repetindo centrifugação e troca do coletor. O uso de dois diferentes tipos de soluções de lavagem AW1 e AW2 melhora significativamente a pureza do RNA e garante a completa remoção de qualquer resíduo contaminante sem afetar a ligação do RNA à membrana. Então, as colunas juntamente com os coletores vazios foram centrifugados em velocidade máxima durante 1 minuto. Depois disso, foram

adicionados 50 µl do tampão de eluição AVE. A **Figura 1** ilustra esta etapa da extração de RNA viral. A amostra final foi incubada à temperatura ambiente de 2 a 5 minutos e depois foi realizada uma última centrifugação em velocidade máxima durante 3 minutos. O RNA viral foi armazenado no freezer (-80°C).

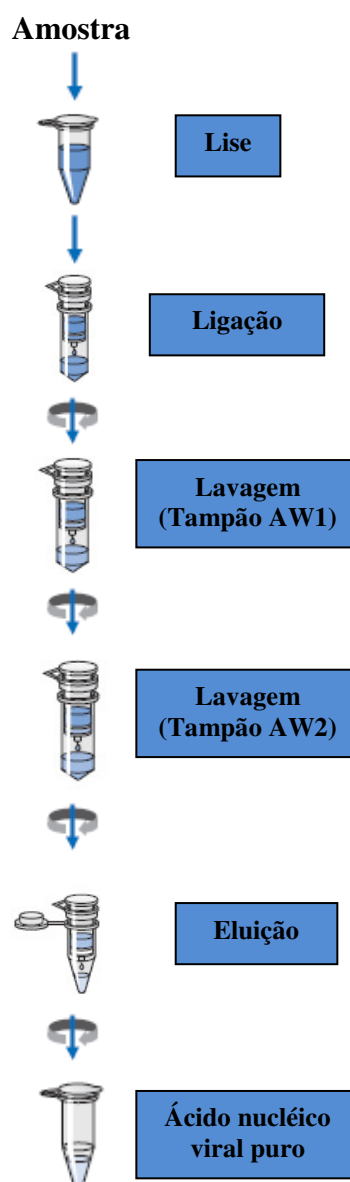


Figura 1. Representação esquemática da etapa de extração de RNA viral. Adaptado de QIAamp Viral RNA Mini Handbook (2010). www.qiagen.com

3.3.3 - Reação de cDNA

A reação de síntese de cDNA foi realizada mediante o preparo de uma solução contendo 1 µl do tampão da transcriptase reversa (10x concentrado); 0,4 µl de desoxiribonucleotídeo trifosfato (dNTP 100 mM); 1 µl do primer randômico (10x concentrado), 0,5 µl da transcriptase reversa (50 U/µL) e 7,1 µl da amostra obtida da extração do RNA viral, totalizando um volume de 10 µl de solução. A reação foi realizada em um Termociclador (Gene Amp® PCR System 9700 Applied Biosystems) e incluiu o primeiro estágio a 25° C durante 10 minutos; o segundo estágio a 37° C durante 120 minutos; o terceiro estágio a 85° C durante 5 segundos e, em seguida, manteve uma temperatura de 4° C. As amostras de cDNA foram armazenadas a -20° C.

3.3.4 - Identificação do HIV pela técnica da PCR em Tempo Real

A PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) é uma técnica capaz de identificar um único fragmento de DNA e amplificá-lo ao ponto de ser detectado. Consiste na amplificação da sequência alvo em três etapas: desnaturação do DNA, hibridação dos iniciadores e polimerização.

Foi utilizada a PCR em Tempo Real, uma técnica que permite o acompanhamento contínuo da amplificação, e com menor risco de contaminação e maior sensibilidade que a PCR convencional (MACHAY et al., 2002). Além disso, permite a visualização da detecção durante a amplificação, e vem sendo empregada para determinação da carga viral ou proviral devido a sua rapidez, precisão e acurácia.

Diferentes fluoróforos, moléculas que absorvem e emitem luz em um comprimento de onda específico, são usados na PCR em tempo real. Os métodos mais

comuns de amplificação para esta técnica são a 5'Nuclease (TaqMan) e SYBR® Green (MACHAY et al., 2002).

A TaqMan usa sondas fluorogênicas na reação de amplificação. A sonda é um oligonucleotídeo que possui um marcador fluorescente emissor no final 5' e um captador próximo ao final 3'. Devido à proximidade dos dois no oligonucleotídeo, não há emissão de fluorescência. Mas durante a amplificação, a sonda que se hibridizou ao produto alvo será clivada pela atividade da enzima *Taq* DNA polimerase, separando o emissor do captador. Assim, ocorrerá um aumento na intensidade de fluorescência, permitindo a quantificação do produto-alvo (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2001).

O SYBR® Green é um corante que quando se liga a moléculas de dupla fita de DNA, aumenta sua emissão fluorescente. A intensidade dessa fluorescência é proporcional à carga viral inicial do indivíduo (MACHAY et al., 2002; NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2001). Uma das desvantagens do uso desse tipo de corante é que ele se liga a qualquer fita dupla de DNA e não apenas ao produto-alvo. Isso pode ser contornado, analisando-se a curva de dissociação do produto. Cada produto tem pico de temperatura de dissociação específico, o que diferencia o produto-alvo de produtos inespecíficos (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2001).

Neste estudo foram utilizados esses dois tipos de métodos para análise das amostras pela PCR em Tempo Real.

3.3.4.1 - TaqMan

Os cDNAs foram analisados pela PCR em Tempo Real quantitativo usando combinações de oligonucleotídeos e sonda específicos do HIV-1: oligonucleotídeo senso

SSF1 (5'-GCT AAC TAG GGA ACC CAC TGC TT-3'), anti-senso SSR1 (5'-CAA CAG ACG GGC ACA CAC TAC T-3'), e sonda SS (5'-FAM-AGC CTC AAT AAA GCT TGC CTT GAG TGC TTC-BHQ1-3'). Cada reação consistia de: 5 µl de cDNA, 12,5 µl da mistura Taqman Universal PCR (2x) (Applied Biosystems, Foster City, CA), 2,5 µl de primer SSF1 (2,5 µM), 2,5 µl de primer SSR1 (2,5 µM), 0,5 µl da sonda SS (2,5 µM), 2 µl de água, totalizando um volume de 25 µl. As amplificações foram realizadas com um aparelho de PCR em tempo real modelo 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA). As condições dos ciclos foram as seguintes: 50°C durante 2 minutos; 40 ciclos a 95°C durante 10 minutos, 95°C durante 15 segundos e 60°C durante 1 minuto.

3.3.4.2 - SYBR® Green

A mistura da reação utilizou 5 µl do cDNA, 0,25 µl de primer 1 (10 µM), 0,25 µl de primer 2 (10 µM), 12,5 µl da mistura SYBR® Green Master Mix (2x), 0,25 µl de CXRD (PROMEGA – Madison – EUA), e 6,75 µl de água, em um total de 25 µl de reação. As amplificações foram realizadas com um aparelho de PCR em Tempo Real modelo 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA). As condições dos ciclos foram as seguintes: 50°C durante 2 minutos; 40 ciclos a 95°C durante 10 minutos, 95°C durante 15 segundos e 60°C durante 1 minuto.

3.3.4.3 - Curva Padrão

O plasmídeo utilizado para construção da curva padrão no experimento foi o pNL4-3. Este é um clone infeccioso do HIV-1, contendo toda a região gênica deste vírus clonado em um vetor pBR322. Para obter a curva padrão da PCR em Tempo Real, este plasmídeo, em uma concentração de 1 µg/ml, foi diluído seriadamente em água (diluições

de 10^{-1} a 10^{-10}) e para a construção da curva padrão foram utilizadas as diluições equivalentes às concentrações de 10^5 a 5 cópias de DNA. A detecção mínima do experimento foi de 100 cópias iniciais.

3.4 – Análise imunológica

3.4.1- Análise do sangue periférico

Como exame de rotina, a coleta e análise do sangue periférico desses pacientes são realizadas a cada 3-4 meses, no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho. Os níveis de linfócitos T CD4+, T CD8+, neutrófilos e CVP foram obtidos dos resultados desses exames presentes nos prontuários médicos de cada paciente. Foram utilizados os exames laboratoriais com data de realização mais próxima possível dos exames clínicos periodontais e das coletas das amostras.

3.5- Análise estatística

Todos os testes estatísticos empregados no presente estudo foram realizados utilizando-se o programa estatístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, versão 17.0). Análises descritivas foram realizadas para as características sócio-demográficas, de comportamentos relacionados à infecção pelo HIV, de doenças passadas ou recentes e da terapia antirretroviral da amostra estudada. Os dados descritivos foram obtidos através do cálculo da frequência e percentagem das categorias dentro de cada variável. Na comparação entre os grupos, as variáveis qualitativas foram analisadas através da frequência de cada categoria, enquanto as variáveis quantitativas foram avaliadas pela média computada para cada paciente, e posteriormente em cada grupo estudado. Diferenças significativas entre os grupos para todos os parâmetros estudados foram avaliadas pelos testes Qui-quadrado, exato de Fisher e Mann-Whitney.

Um modelo logístico binário ajustado, através da Equação de Estimação Generalizada (GEE), foi utilizado para estimar o efeito das co-variáveis (variáveis preditoras) sobre a carga viral subgengival (variável resposta ou desfecho). Optou-se por um desfecho dicotômico (detecção ou indetecção de HIV-1 no biofilme subgengival), para facilitar a interpretação dos resultados, usando como referência a indetecção do HIV-1 no biofilme subgengival. Este modelo foi escolhido, pois uma destas co-variáveis, a profundidade de bolsa a sondagem (PBS), era formada por dados com dependência entre si (vários sítios periodontais correlacionados entre si por pertencerem ao mesmo indivíduo), ou seja, dados agrupados. Para esta análise múltipla, só foram utilizadas as co-variáveis que apresentaram $p < 0,05$ na comparação entre os grupos CV detectável e indetectável.

4- RESULTADOS

4.1- Características sócio-demográficas, de comportamentos relacionados à saúde, clínicas e laboratoriais dos pacientes estudados

A **Tabela 1** apresenta as características sócio-demográficas e de comportamentos relacionados à saúde de toda a amostra estudada. A maioria dos indivíduos era composta por homens (51,2%), brancos (39%), com mais de 41 anos de idade (50%) e com ensino médio incompleto (61%). A grande maioria não era usuária de drogas (85,4%), e poucos eram tabagistas (14,6%) e, além disso, consumidores diário de álcool (12,2%).

O resumo de doenças passadas ou recentes dos 41 pacientes infectados pelo HIV estudados está demonstrado na **Tabela 2**. As condições mais frequentemente relatadas foram diarreia (63,4%) e aftas recorrentes (70%), enquanto a retinite por citomegalovírus (CMV) foi relatada por apenas um paciente (2,4%). A maioria era portador de periodontite (51,2%) e tinha mais de 10 anos de exposição ao HIV (68,3%).

No que diz respeito à medicação em uso, a **Tabela 3** descreve a frequência de antirretroviral, TARV e sulfametoxazol+trimetoprima. A maioria fazia uso de TARV (65,9%), e lamivudina (70,7%), tenofovir (57,5%) e zidovudina (37,5%) foram os antirretrovirais mais frequentemente utilizados. Além dos antiretrovirais, 15% dos pacientes estavam expostos à terapia combinada de sulfametoxazol+trimetoprima para tratamento de pneumonia por *Pneumocystis jirovecii*, anteriormente denominado *Pneumocystis carinii*.

Tabela 1. Características sócio-demográficas e de comportamentos relacionados à saúde dos 41 pacientes estudados.

<i>Características</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
<i>Parâmetros socio-demográficos</i>		
Idade		
18-30 anos	02	5
31-40 anos	18	45
≥41 anos	20	50
Gênero		
Masculino	21	51,2
Feminino	20	48,8
Cor		
Branco	16	39,0
Negro	13	31,7
Pardo	12	29,3
Escolaridade		
Ensino médio incompleto	25	61,0
Ensino médio completo ou mais	16	39,0
<i>Comportamentos relacionados à saúde</i>		
Usuário de drogas		
Sim	06	14,6
Não	31	85,4
Tabagismo		
Sim	06	14,6
Não	26	63,4
Ex-fumante	09	22,0
Álcool		
Sim (diariamente)	05	12,2
Não ou socialmente	36	87,8

Tabela 2. Doenças passadas ou recentes dos 41 pacientes infectados pelo HIV estudados.

<i>Características</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
Tuberculose		
Sim	12	29,3
Não	29	70,7
Periodontite		
Sim	21	51,2
Não	20	48,8
Diarréia		
Sim	26	63,4
Não	15	36,6
Pneumonia		
Sim	13	31,7
Não	28	68,3
Herpes labial		
Sim	13	31,7
Não	28	68,3
Herpes zoster		
Sim	12	29,3
Não	29	70,7
Candidíase oral		
Sim	09	22,0
Não	32	78,0
Retinite por CMV		
Sim	01	2,4
Não	40	97,6
Distúrbios emocionais		
Sim	14	34,1
Não	27	65,9
Anemia		
Sim	10	24,4
Não	31	75,6
Aftas recorrentes		
Sim	28	70,0
Não	12	30,0
Tempo de exposição ao HIV		
1-10 anos	13	31,7
11-20 anos	25	61,0
≥ 21 anos	03	7,3

CMV: citomegalovírus

Tabela 3. Frequência do uso de antiretroviral, TARV e sulfametoxazol+trimetoprima pelos 41 pacientes estudados.

<i>Medicação em uso</i>	<i>%</i>
TARV	65,9
ITRAN	
Zidovudina	37,5
Didanosina	2,5
<i>Lamivudina</i>	70,7
Tenofovir	57,5
ITRNN	
Efavirenz	7,5
Nevirapina	5,0
IP*	
Atazanavir	20,0
Darunavir	2,5
Fosamprenavir	5,0
Lopinavir + Ritonavir	27,5
Ritonavir	27,5
Inibidor de fusão	
Enfuvirtida	2,5
Inibidor de integrase	
Raltegravir (T-20)	2,5
Antibacteriano sistêmico	
Sulfametoxazol+trimetoprima	15,0

ITRAN: Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeos; **ITRNN:** Inibidor de Transcriptase Reversa Não-análogo de Nucleosídeos; **IP*:** Inibidor da Protease

Quando os dois grupos (CVP detectável e indetectável) foram comparados com relação aos dados laboratoriais, somente os níveis de linfócitos TCD4+ apresentaram diferenças significantes entre os grupos ($p = 0,038$, teste de Mann-Whitney) (**Tabela 4**)

Tabela 4. Comparação dos dados laboratoriais entre os grupos carga viral plasmática (CVP) detectável e indetectável

<i>Dados laboratoriais</i> <i>[mediana (min-max)]</i>	<i>CV indetectável</i> <i>(N = 21)</i>	<i>CV detectável</i> <i>(N = 20)</i>	<i>P</i> <i>valor*</i>
Linfócitos TCD4+ [§]	589 (193 – 986)	436 (11 – 1133)	0,038
Linfócitos TCD8+ [§]	752 (410 – 1.763)	902 (393 – 2.746)	0,165
Leucócitos totais [§]	5.750 (3.200 – 8.230)	5.600 (2.500 – 12.520)	0,616
Linfócitos	1.782 (1.200 – 4.075)	1.769 (850 – 4.050)	0,345
Neutrófilos	2.964 (1.376 – 5.431)	2.818 (1.177 – 7.084)	0,291

[§] Células/ mm³ de sangue * Teste de Mann-Whitney

Após comparação dos dois grupos (CVP detectável e indetectável) com relação aos parâmetros socio-demográficos e de comportamentos relacionados à saúde, não foi observada diferença estatisticamente significativa para todas essas variáveis estudadas ($p > 0,05$, teste Qui-quadrado ou teste exato de Fisher) (**Tabela 5**).

Na **Tabela 6**, foi realizada uma comparação das características relacionadas à infecção pelo HIV entre os grupos CVP detectável e indetectável. O uso de TARV e carga viral subgengival foram as únicas variáveis que demonstraram diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$, teste exato de Fisher).

Tabela 5. Comparação das características sócio-demográficas e do comportamento relacionado à saúde entre os grupos carga viral plasmática (CVP) detectável e indetectável.

<i>Características</i>	<i>CVP indetectável (N = 21)</i>	<i>CVP detectável (N = 20)</i>	<i>P valor</i>
Parâmetros socio-demográficos			
<i>N (%)</i>			
Idade*			0,356
18 – 29	1 (4,8)	1 (4,9)	
30 – 39	6 (28,6)	10 (50,0)	
≥ 40	14 (66,7)	9 (45,0)	
Gênero[¶]			0,879
Masculino	11 (52,4)	10 (50)	
Feminino	10 (47,6)	10 (50)	
Cor*			0,367
Branco	8 (38,1)	8 (40,0)	
Negro	5 (23,8)	8 (40,0)	
Pardo	8 (38,1)	4 (20,0)	
Escolaridade[¶]			0,160
Até ensino médio incompleto	15 (71,4)	10 (50,0)	
Ensino médio completo ou mais	6 (28,6)	10 (50,0)	
Comportamentos relacionados à saúde			
Usuário de drogas*			0,948
Sim	3 (14,3)	3 (15,0)	
Não	18 (85,7)	17 (85,0)	
Tabagismo*			0,066
Sim	1 (4,8)	5 (25,0)	
Não	13 (61,9)	13 (65,0)	
Ex-fumante	7 (33,3)	2 (10,0)	
Álcool*			0.136
Sim (diariamente)	1 (4,8)	4 (20,0)	
Não ou só socialmente	20 (95,2)	16 (80,0)	

[¶] Teste Qui-quadrado, *Teste exato de Fisher

Tabela 6. Comparação das características relacionadas à infecção pelo HIV entre os grupos carga viral plasmática (CVP) detectável e indetectável.

<i>Características</i>	<i>CVP indetectável (N = 21)</i>	<i>CVP detectável (N = 20)</i>	<i>P valor*</i>
<i>N (%)</i>			
Tempo de exposição ao HIV			0,060
1-10 anos	5 (23,8)	8 (40,0)	
11-20 anos	16 (76,2)	9 (45,0)	
≥ 21 anos	0 (0,0)	3 (15,0)	
TARV[§]			
Sim	20 (95,2)	7 (36,8)	< 0,001
Não	1 (4,8)	12 (63,2)	
CV subgengival			
Indetectável	21 (100)	12 (60,0)	0,001
Detectável	0	8 (40,0)	
Uso Bactrim[§]			
Sim	1 (4,8)	5 (26,3)	0,071
Não	20 (95,2)	14 (73,7)	

*Teste exato de Fisher [§] Informação referente a 40 pacientes

No grupo CVP detectável, foi realizada uma comparação descritiva entre a CV plasmática e os níveis de CV subgengival para cada paciente (Tabela 7). Observou-se que 40% dos indivíduos que apresentaram CV plasmática detectável demonstraram CV subgengival detectável. Entretanto, não houve correlação significativa entre CV plasmática e CV subgengival (dados não demonstrados). A CV subgengival também não apresentou correlação significativa com nenhum parâmetro clínico periodontal (dados não demonstrados).

A **Tabela 8** resume as características dos parâmetros clínicos periodontais dos dois grupos para sítios coletados e todos os sítios examinados. O único parâmetro clínico

estatisticamente significativa foi profundidade de bolsa à sondagem (PBS) dos sítios coletados ($p < 0,05$, teste de Mann-Whitney).

Tabela 7. Comparação descritiva entre a CV plasmática e a CV subgengival para cada paciente do grupo CV detectável

<i>Número do paciente</i>	<i>CV plasmática^δ</i>	<i>Número de pools de sítios com CV subgengival detectável</i>	<i>CV subgengival^δ</i>
70	631	1	283
135	14498	0	0,0
130	7597	1	2248
134	444	1	225
131	1173	0	0,0
101	38614	1	3334
127	37779	0	0,0
89	20600	0	0,0
133	1101	1	500
132	1557	0	0,0
138	3697	0	0,0
139	830	0	0,0
56	4841	0	0,0
140	34221	0	0,0
144	479	0	0,0
21	5300	1	411
87	2282	1	233
76	7863	0	710,5
60	417	1	4222
45	1306	0	0,0

^δCópias/mL

Tabela 8. Comparação dos parâmetros periodontais entre os grupos carga viral plasmática (CVP) detectável e indetectável.

<i>Características Periodontais</i>	<i>CVP indetectável (N = 21)</i>	<i>CVP detectável (N = 20)</i>	<i>P valor</i>
<i>Periodontite – N(%)</i> *	11 (52,4%)	10 (50%)	0,879
<i>Média (DP) dos sítios coletados^Ω</i>			
NIC	3,3 (0,8)	3,6 (1,0)	0,196
PBS	2,9 (0,5)	3,4 (0,8)	0,016
IP	61,1 (33,5)	67,9 (26,7)	0,318
SS	38,9 (30,0)	49,1 (29,5)	0,116
<i>Média (DP) do exame periodontal completo^Ω</i>			
NIC	2,6 (0,4)	2,4 (1,1)	0,317
PBS	2,3 (0,3)	2,5 (0,5)	0,197
IP	40,7 (16,4)	49,5 (20,6)	0,103
SS	18,0 (14,3)	23,2 (23,4)	0,216

PBS (profundidade de bolsa à sondagem), **NIC** (nível de inserção clínico), **IP** (índice de placa visível), **SS** (sangramento à sondagem), **DP** (desvio padrão). *Teste exato de Fisher, ^ΩTeste de Mann Whitney

Foi realizada uma análise bivariada entre as co-variáveis do nível do indivíduo que apresentaram diferença significativa entre os grupos CVP detectável e indetectável (uso de TARV, níveis de linfócitos TCD4+, média de PBS dos sítios coletados), além dos níveis de CVP, e o desfecho CV subgengival (Tabela 9). Significância estatística foi encontrada somente para a co-variável níveis de linfócitos TCD4+ (p = 0,017; teste exato de Fisher).

Os resultados do modelo logístico, que utilizou a equação de estimação generalizada, buscando o efeito das co-variáveis utilizadas na análise bivariada (**Tabela 9**) sobre o desfecho CV subgengival indetectável estão apresentados na **Tabela 10**. Nesta análise, no lugar da média de PBS de cada paciente, incluímos no modelo os valores de PBS de todos os 372 sites coletados. A única co-variável que apresentou efeito sobre o desfecho foi nível de linfócitos TCD4+, demonstrando que indivíduos com níveis ≥ 500 células/mm³ têm uma chance oito vezes maior de ter CV subgengival indetectável em comparação com aqueles apresentando níveis < 200 células/mm³ ($p = 0,017$).

Tabela 9. Análise bivariada entre as co-variáveis do nível do indivíduo e o desfecho CV subgengival.

<i>Co-variável</i>	<i>CV subgengival</i>		<i>P valor</i>
	<i>Indetectável</i> (<i>N</i> = 33)	<i>Detectável</i> (<i>N</i> = 8)	
<i>N(%)</i>			
CV plasmática[¶]			
0-3 log	23 (69,7)	3 (37,5)	0,082
>3 log	10 (30,3)	5 (62,5)	
TARV[¶] §			
Sim	23 (71,9)	4 (50,0)	
Não	9 (28,1)	4 (50,0)	0,400
Linfócitos TCD4+[¶]			
0 - 199	3 (9,1)	4 (50,0)	0,017
200 - 499	9 (27,3)	2 (25)	
≥ 500	19 (63,8)	2 (25)	
Média (DP)			
PBS dos sites coletados*	3,1 (0,7)	3,1(0,7)	0,753

* Teste de Mann-Whitney, [¶] Teste exato de Fisher, [§] Informação referente a 40 pacientes

Tabela 10. Modelo logístico utilizando equação de estimação generalizada para estimar o efeito das co-variáveis sobre o desfecho carga viral subgengival indetectável

<i>Covariáveis</i>	<i>β</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>RC</i>	<i>IC 95%</i>		<i>P valor</i>
				<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>	
CVplasmática						
0 -3 log			1			
>3 log	-0,13	0,70	0,88	-1,5	1,2	0,851
TARV						
Não			1			
Sim	-0,74	0,71	0,48	-2,1	0,6	0,292
Linfócito TCD4+						
0 - 199			1			
200 - 499	-0,06	0,88	0,11	-1,8	1,7	0,945
≥ 500	2,18	0,72	8,85	3,6	9,2	0,002
PBS dos 372 sítios coletados	-0,17	0,25	0,84	-0,7	0,3	0,504

A **Figura 2** ilustra a construção da curva padrão realizada com a PCR em Tempo Real nas diluições de 10^5 a 5 cópias do plasmídeo.

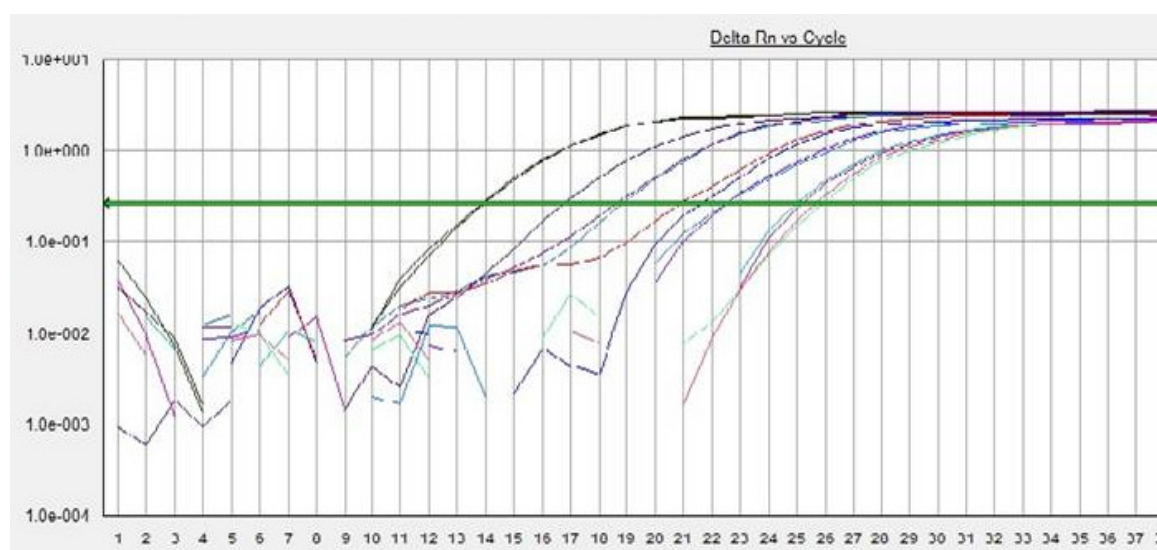


Figura 2. Amplificação da curva padrão realizada no estudo.

A Figura 3 representa uma amostra do biofilme com carga viral subgingival positiva (seta vermelha). Observe que a amostra que está apontada pela seta azul parece ter um sinal inicial que decresce e depois volta já muito próximo de quando temos o controle negativo, caracterizando uma amostra negativa.

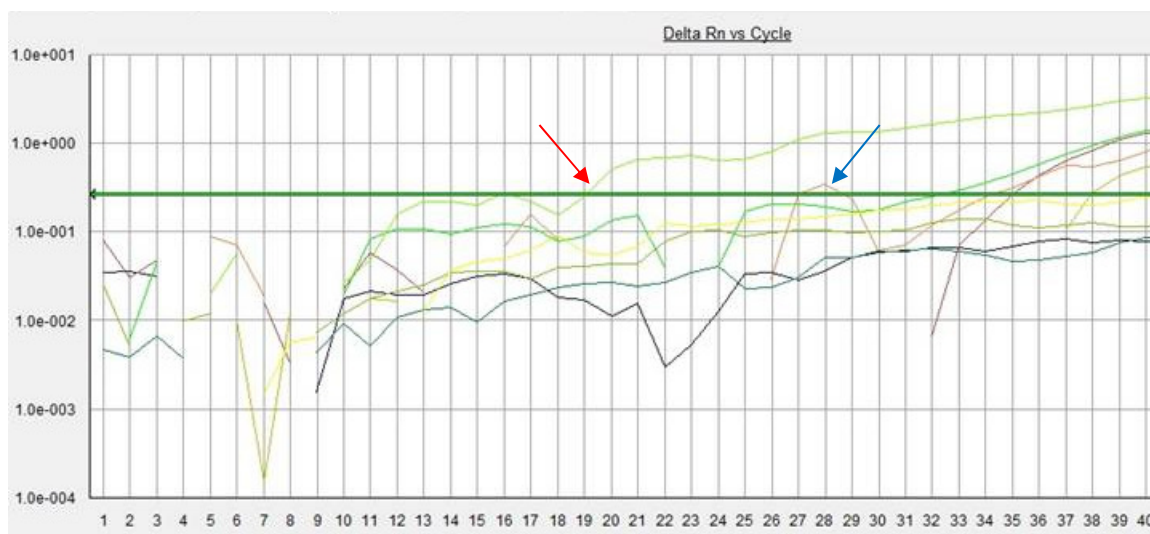


Figura 3. Amplificação de amostra de carga viral subgingival

Para confirmação de que o vírus detectado na amostra era do biofilme subgingival e não provírus presente nas células mononucleares do sangue periférico, que, ocasionalmente, estava presente em algumas amostras, foi feito um PCR em Tempo Real dessas amostras positivas com o RNA extraído diretamente, sem que fosse realizada a reação de c-DNA. Todas as amostras analisadas nesta etapa foram negativas. Este fato sugere que a detecção do vírus era realmente proveniente do biofilme subgingival.

5-DISCUSSÃO

O presente estudo investigou a associação entre a carga viral subgengival no biofilme e a carga viral plasmática e os parâmetros clínicos periodontais. Provavelmente, este é o primeiro estudo que identificou e quantificou o HIV-1 no biofilme subgengival em pacientes infectados pelo HIV.

A amostra era composta na sua grande maioria por pacientes com mais de 10 anos de exposição ao HIV (68,3%), o que demonstra aumento na expectativa de vida dos pacientes infectados pelo HIV, muito provavelmente devido ao maior acesso da população brasileira à TARV (LEVI & VITÓRIA, 2002). Além disso, a alta frequência no uso da TARV (65,9%) também pode explicar a baixa frequência de doenças associadas à imunodeficiência, sendo diarreia e aftas recorrentes as condições mais observadas.

Apesar da história natural da infecção pelo HIV ser descrita como um declínio progressivo da função do sistema imune, a taxa de progressão varia substancialmente entre os pacientes. A contagem de linfócitos T CD4+ e carga viral plasmática do paciente infectado pelo HIV têm sido os principais marcadores laboratoriais de progressão da doença nos últimos anos (MELLORS et al., 1997). A determinação da carga viral plasmática é, atualmente, estabelecida como uma valiosa ferramenta para determinar os efeitos da terapia antirretroviral (PERELSON et al., 1997).

Diversos estudos têm demonstrado uma forte associação entre a presença de determinadas lesões orais, tais como leucoplasia pilosa, candidíase oral e doenças periodontais, como eritema gengival linear e gengivite ou periodontite ulcerativa necrosante, e a imunodeficiência avançada, determinada principalmente pelos níveis de linfócitos T CD4+ no sangue periférico (MONIACI et al., 1990; BARR et al., 1990; FEIGAL et al., 1991; FARIZO et al., 1992; GLICK et al., 1994; KOLOKOTRONIS et

al., 1994; BEGG et al., 1996; JOHNSON et al., 1997; MARGIOTTA et al., 1999). Entretanto, esta associação ainda não está clara no que diz respeito à periodontite crônica (GONÇALVES et al., 2005). Apesar disso, Gonçalves et al. (2007) demonstraram que um longo período de exposição à TARV, que normalmente leva a um declínio significativo da carga viral plasmática e eleva os níveis de linfócitos T CD4+ (UNAIDS, 2008), resultou em redução da gravidade das características clínicas periodontais em uma amostra de brasileiros infectados pelo HIV portadores de periodontite crônica. Entretanto, em um estudo recentemente realizado por Fricke et al. (2012) este achado não foi observado.

A carga viral plasmática do HIV-1 também parece ter uma associação significativa com a presença de lesões orais fortemente associadas à infecção pelo HIV (MARGIOTTA et al., 1999) visto que este parâmetro laboratorial está associado à contagem de linfócitos T CD4+ (BAGNARELLI et al., 1992), além de estar relacionado com o estágio clínico da doença e funcionar como um marcador do sucesso ou fracasso da terapia antirretroviral (MARGIOTTA et al., 1999).

Com relação aos dados laboratoriais, houve diferença significante entre os dois grupos estudados somente para os níveis de linfócitos T CD4+. Esse resultado sugere que o grupo com CVP detectável, que apresentou valores menores na contagem de linfócitos T CD4+, pode estar em maior risco de desenvolver infecções, como por exemplo, doenças periodontais. Entretanto, Gonçalves et al. (2005) compararam grupos de indivíduos infectados pelo HIV com e sem doença periodontal e não observaram associação entre os níveis de linfócitos T CD4+ e a condição periodontal desses indivíduos.

Quando as características relacionadas à infecção pelo HIV foram comparadas entre os grupos CVP detectável e indetectável, somente o uso de TARV e carga viral

subgingival demonstraram diferenças significativas. O uso de TARV inibe a replicação do HIV-1, podendo gerar uma carga viral plasmática com níveis abaixo do limite de detecção (abaixo de 50 cópias/mL) (HAMMER et al., 1997; POGGI et al., 1999). As técnicas utilizadas para detecção do HIV-1 incluem o PCR. Entretanto, esse método, além de ser tecnicamente difícil, representa uma determinação apenas qualitativa, não sendo possível quantificar o número de cópias virais presentes na amostra, o que é uma importante ferramenta para o diagnóstico da infecção pelo HIV e também uma forma de monitorar a terapia antirretroviral (GIBELLINI et al., 2004). A técnica do PCR em Tempo Real representa um método mais adequado de diagnóstico pela sensibilidade, especificidade e possibilidade de quantificação viral da infecção (ALDEA et al., 2002; DESIRE et al., 2001; MORRISON et al., 1998). Além disso, esta técnica não requer eletroforese em gel ou qualquer outra manipulação pós-PCR para análise da amostra, reduzindo o tempo e a possibilidade de contaminação (GIBELLINI et al., 2004).

No presente estudo, para realizar a detecção e quantificação da CV subgingival, optou-se pelo emprego da técnica do PCR em Tempo Real. No grupo de pacientes com CV plasmática detectável, foi observado que 40 % dos indivíduos apresentaram CV subgingival detectável. Por outro lado, todos os pacientes com CV plasmática indetectável apresentaram CV subgingival indetectável, sugerindo uma possível participação dos linfócitos T CD4+ nessa correlação, em virtude deste grupo demonstrar níveis significativamente maiores destas células em comparação com aquele grupo. Estes achados estão de acordo com o estudo de Maticic et al. (2000), que detectaram o HIV-1 em 49% das amostras de fluido do sulco gengival e demonstraram correlação significativa com a carga viral plasmática. Além disso, nenhum dos pacientes infectados pelo HIV com níveis de linfócitos T CD4+ > 500 células/mm³ demonstrou detecção do vírus no fluido do sulco gengival.

Quando os parâmetros periodontais foram comparados entre os grupos CV plasmática detectável e indetectável, houve diferença significativa somente para PBS dos sítios coletados. Este achado poderia explicar em parte a detecção do HIV-1 no sítio subgingival de alguns pacientes do grupo detectável por apresentarem média de PBS dos sítios coletados (3,6 mm) maior do que o grupo indetectável (3,3 mm). Entretanto, ao realizar a análise bivariada entre as covariáveis do nível do indivíduo e o desfecho CV subgingival isso não foi confirmado, pois apenas os níveis de linfócitos T CD4+ apresentaram diferença significativa. Contudo, este resultado pode sugerir um possível efeito da contagem de linfócitos T CD4+ na CV subgingival. Com relação ao uso de TARV, esta análise não demonstrou significância para a CV subgingival. Este resultado está de acordo com o encontrado por Maticic et al. (2000) que também não observou correlação entre o uso de TARV e a detecção do vírus nas amostras do fluido gengival.

Como o presente estudo utilizou vários sítios subgingivais para coletar o biofilme em cada indivíduo, e por isso tendem a se comportar de forma mais semelhante que sítios de indivíduos diferentes, foi necessário considerar essa dependência para que fosse possível avaliar a relação entre as co-variáveis e o desfecho estudado. Desse modo, não foi possível utilizar nenhum dos modelos tradicionais de regressão, pois estes partem da suposição da independência entre as observações do mesmo indivíduo. Sendo assim, o modelo escolhido foi a Equação de Estimação Generalizada (GEE), que foi proposto por ZEGER & LIANG (1986) e LIANG & ZEGER (1986) com o objetivo de estimar parâmetros de regressão quando os dados estão correlacionados. Apesar da existência desse modelo e de ele estar implementado em programas estatísticos como o SPSS, ainda é pouco comum encontrar artigos, principalmente no Brasil, que utilizem o modelo adequado para dados correlacionados (AGRANONIK, 2009).

Após a aplicação do modelo logístico utilizando GEE, foi observado que a única co-variável que apresentou efeito significativo sobre o desfecho CV subgengival indetectável foi o nível de linfócito T CD4+. A interpretação dos resultados demonstra que indivíduos com níveis de linfócito T CD4+ > 500 células/mm³ tem uma chance muito maior de apresentar CV subgengival indetectável em relação aos indivíduos com níveis de linfócito T CD4+ < 200 células/mm³. Esses achados estão de acordo com os encontrados por Maticic et al. (2000), como descrito anteriormente. Contudo, estes autores não souberam explicar o efeito do HIV-1 no fluido gengival, e especularam se ele seria ou não capaz de funcionar como um reservatório do vírus para disseminação da infecção. O presente estudo detectou e quantificou este vírus no biofilme gengival, e a hipótese de reservatório para o HIV também pode ser especulada.

Os resultados aqui apresentados precisam ser considerados com cautela em função das limitações do estudo. Por ser um estudo seccional, apenas associações podem ser feitas, e não inferências causais. Além disso, o pequeno tamanho da amostra pode ter contribuído para a ausência de diferenças estatísticas entre os grupos CV plasmática para algumas variáveis estudadas. Outra limitação importante foi a coleta do biofilme, na qual não permitiu separar o biofilme subgengival dos componentes do fluido do sulco gengival. A ausência de outros trabalhos pesquisando a presença do HIV-1 no biofilme subgengival também é uma limitação, que dificulta o conhecimento acerca da metodologia ideal para conduzir este tipo de trabalho.

Apesar das limitações deste estudo, estes resultados podem contribuir para um melhor conhecimento a respeito da presença do HIV-1 no ambiente subgengival. Na atual era da infecção pelo HIV, os indivíduos soropositivos para esse vírus estão vivendo cada vez mais e, conseqüentemente, o tempo de exposição à doença também aumenta. Assim, é fundamental entender o comportamento do HIV-1 nos sítios subgengivais e verificar o

possível efeito da sua presença por longo período de tempo não apenas para a condição periodontal, mas também para a saúde sistêmica do indivíduo. Entretanto, futuros estudos ainda serão necessários para alcançar tais objetivos.

6- CONCLUSÃO

De acordo com os resultados do presente estudo, não há associação da carga viral no biofilme subgengival com a carga viral plasmática do HIV-1 e os parâmetros clínicos periodontais em pacientes infectados pelo HIV.

7- REFERÊNCIAS

AGRANONIK. Equações de estimação generalizadas (GEE): Aplicação em estudo sobre mortalidade neonatal em gemelares de Porto Alegre, RS (1995-2007). Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia, Dezembro 2009.

ALDEA, C.; ALVAREZ, C.P.; FOLGUEIRA, L.; DELGADO, R.; OTERO, J.R. Rapid detection of herpes simplex virus DNA in genital ulcers by real-time PCR using SYBR green I dye as the detection signal. *J Clin Microbiol.*, 2002, 40: 1060–2.

ALPAGOT, T.; FONT, K.; LEE, A. Longitudinal evaluation of GCF IFN-gamma levels and periodontal status in HIV+ patients. *J Clin Periodontol.*, 2003, 30: 944–948.

ALPAGOT, T.; DUZGUNES, N.; WOLFF, L.F.; LEE, A. Risk factors for periodontitis in HIV patients. *J Periodontal Res.*, 2004, 39: 149–157.

ALPAGOT, T.; SUZARA, V.; BHATTACHARYYA, M. The associations between gingival crevice fluid matrix metalloproteinase- 9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and periodontitis in human immunodeficiency virus-positive patients. *J Periodontal Res.*, 2006, 41: 491–497.

ALPAGOT, T.; REMIEN, J.; BHATTACHARYYA, M.; KONOPKA, K.; LUNDERGAN, W.; DUZGUNES, N. Longitudinal evaluation of prostaglandin E2 (PGE2) and periodontal status in HIV+ patients. *Arch Oral Biol.*, 2007, 52: 1102–1108.

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, 79: 123–130.

ALVES, M.; MULLIGAN, R.; PASSARO, D.; GAWELL, S.; NAVAZESH, M.; PHELAN, J. et al. Longitudinal evaluation of loss of attachment in HIV-infected women compared to HIV-uninfected women. *J Periodontol.*, 2006, 77: 773–9.

BAGNARELLI, P.; MENZO, S.; VALENZA, A.; MANZIN, A.; GIACCA, M.; ANCARANI, F. et al. Molecular profile of human immunodeficiency virus type 1 infection in symptomless patients and in patients with AIDS. *J Virol.*, 1992, 66: 7328-7335.

BARR, C.E.; LOPEZ, M.R.; RUA-DOBLES, A.; MILLER, L.K.; MATHUR-WAGH, U.; TURGEON, L.R. HIV-associated oral lesions: immunologic, virologic and salivary parameters. *J Oral Pathol Med.*, 1990, 21: 295-8.

BARR, C.; LOPEZ, M.R.; RUA-DOBLES, A. Periodontal changes by HIV serostatus in a cohort of homosexual and bisexual men. *J Clin Periodontol.*, 1992, 19: 794-801.

BEGG, M.; PANAGEAS, K.S.; MITCHELL-LEWIS, D.; BUKLAN, R.S.; PHELAN, J.A.; LAMSTER, I.B. Oral lesions as markers of severe immunosuppression in HIV-infected homosexual men and injection drug users. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.*, 1996, **82**: 276-83.

BLACK, K.P.; MERRILL, K.W.; JACKSON, S.; KATZ, J. Cytokine profiles in parotid saliva from HIV-1-infected individuals: changes associated with opportunistic infections in the oral cavity. *Oral Microbiol Immunol.*, 2000, 15: 74-81.

BLANKSON, J.N.; PERSAUD, D.; SILICIANO, R.F. The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. *Annu Rev Med.*, 2002, 53: 557-593.

CASELLI, E.; GALVAN, M.; CASSAI, E.; CARUSO, A.; SIGHINOLFI, L.; DI LUCA, D. Human herpesvirus 8 enhances human immunodeficiency virus replication in acutely infected cells and induces reactivation in latently infected cells. *Blood.*, 2005, 106: 2790-2797.

C. BOY, SONJA.; VAN HEERDEN, MARLENE B.; WOLFAARDT, MARIANNE.; COCKERAN, RIANA.; GEMA, ELIZE.; VAN HEERDEN, WILLIE F. An investigation of the role of oral epithelial cells and Langerhans cells as possible HIV viral reservoirs. *J Oral Pathol Med.*, 2009, 38: 114-119.

CHERMANN, J.C.; BARRE-SINOUSSE, F.; DAUGUET, C. et al. Isolation of a new retrovirus in a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome. *Antibiot Chemother.*, 1983, 32: 48–53.

CINQUE, P.; BESTETTI, A.; MORELLI, P.; PRESI, S. Molecular analysis of cerebrospinal fluid: potential for the study of HIV-1 infection of the central nervous system. *J Neurovirol.*, 2000, (Suppl 1): S95-S102.

CINQUE, P.; BOSSOLASCO, S.; LUNDKVIST, A. Molecular analysis of cerebrospinal fluid in viral diseases of the central nervous system. *Journal of Clinical Virology.*, 2003, 26: 1-28.

COHEN, M.S.; HELLMANN, N.; LEVY, J.A.; DECOCK, K.; LANGE, J. The spread, treatment, and prevention of HIV-1: evolution of a global pandemic. *J Clin Invest.*, 2008, 118: 1244-1254.

COLLMAN, R.G.; PERNO, C.F.; CROWE, S.M.; STEVENSON, M.; MONTANER, L.J. HIV and cells of macrophage/dendritic lineage and other non-T cell reservoirs: new answers yield new questions. *J Leukoc Biol.*, 2003, 74: 631–634.

CONTRERAS, A. et al. Relationship between herpesviruses and adult periodontitis and periodontopathic bacteria. *J Periodontol.*, 1999, 70: 478-484.

DESIRE, N.; DEHEE, A.; SCHNEIDER, V. et al. Quantification of human immunodeficiency virus type 1 proviral load by a TaqMan real-time PCR assay. *J Clin Microbiol.*, 2001, 39: 1303–10.

DRINKARD, C.R.; DECHER, L.; LITTLE, J.W.; RHAME, F.S.; BALFOUR, H.H JR.; RHODUS, N.L. et al. Periodontal status of individuals in early stages of human immunodeficiency virus infection. *Community Dent Oral Epidemiol.*, 199, 19: 281–5.

FARIZO, D.W.; KATZ, M.H.; GREENSPAN, D. et al. Spectrum of disease in persons with human immunodeficiency virus infection in the United States. *JAMA.*, 1992, 267:1798-805.

FEIGAL, D.W.; KATZ, M.H.; GREENSPAN, D. et al. The prevalence of oral lesions in HIV-infected homosexuals and bisexual men: three San Francisco epidemiological cohorts. *AIDS*, 1991, 5: 519-25.

FREED, E.O.; MOULAND, A.J. The cell biology of HIV-1 and other retroviruses. *Retrovirology*, 2006, 3: 77.

FRICKE, U.; GEURTSSEN, W.; STAUFENBIEL, I.; RAHMAN, A. Periodontal status of HIV-infected patients undergoing antiretroviral therapy compared to HIV-therapy naïve patients: a case control study. *European Journal of Medical Research*, 2012, 17: 2.

FRIEDMAN, R.B.; GUNSOLLEY, J.; GENTRY, A.; DINIUS, A.; KAPLOWITZ, L.; SETTLE, J. Periodontal status of HIV-seropositive and AIDS patients. *J Periodontol*, 1991, 62: 623–7.

GIACAMAN, R.A.; NOBBS, A.H.; ROSS, K.F.; HERZBERG, M.C. *Porphyromonas gingivalis* Selectively Up-Regulates the HIV-Coreceptor CCR5 in Oral Keratinocytes. *J Immunol*, 2007, 179: 2542–50.

GIACAMAN, R.A.; ASRANI, A.C.; GEBHARD, K.H.; DIETRICH, E.A.; VACHARAKSA, A.; ROSS, K.F.; et al. *Porphyromonas gingivalis* induces CCR5-dependent transfer of infectious HIV-1 from oral keratinocytes to permissive cells. *Retrovirology* 2008; 5: 29.

GIBELLINI, D.; VITONE, F.; SCHIAVONE, P.; PONTI, C.; LA PLACA, M.; RE, M.C. Quantitative detection of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) proviral DNA in peripheral blood mononuclear cells by SYBR green real-time PCR technique. *Journal of Clinical Virology*, 2004, 29: 282–289.

GLICK, M.; MUZYKA, B.C.; LURIE, D.; SALKIN, L.M.; CAMDEN, N.J. Oral manifestations associated with related disease as markers for immune suppression and AIDS. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1994, 77: 344-9.

GOLETTI, D.; WEISSMAN, D.; JACKSON, R.W. et al. Effect of Mycobacterium tuberculosis on HIV replication role of immune activation. *J Immunol.*, 1996, 157: 1271–1278.

GONÇALVES, L.S.; FERREIRA, S.M.; SILVA, A. JR, VILLORIA, G.E.; COSTINHA, L.H.; COLOMBO, A.P. Association of T CD4 lymphocyte levels and chronic periodontitis in HIV-infected brazilian patients undergoing highly active anti-retroviral therapy: clinical results. *J Periodontol.*, 2005, 76: 915-922.

GONÇALVES, L.S.; FERREIRA, S.M.; SOUZA, C.O.; SOUTO, R.; COLOMBO, A. P. Clinical and microbiological profiles of human immunodeficiency virus (HIV)-seropositives Brazilians undergoing highly active antiretroviral therapy and HIV-seronegatives Brazilians with chronic periodontitis. *J Periodontol.*, 2007,78: 87-96.

GONZÁLEZ, A.O.; EBERSOLE, J.L.; HUANG, C.B. Oral infectious diseases: a potential risk factor for HIV virus recrudescence. *Oral Diseases.*, 2009, 15: 313–327.

GROOPMAN, J.E.; SALAHUDDIN, S.Z.; SARNGADHARAN, M.G.; MARKHAM, P.D.; GONDA, M.; SLISKI, A. et al. HTLV-III in saliva of people with AIDS-related complex and healthy homosexual men at risk for AIDS. *Science.*, 1984, 226: 477-479.

HADLEY, W.K. Infection control issues for laboratory personnel. *Occup Med.*, 1989, 4: 77-83.

HAMMER, S.M.; SQUIRES, K.E.; HUGHES, M.D. et al. A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team. *N Engl J Med.*, 1997, 337: 725–33.

HO, D.D.; BYINGTON, R.E.; SCHOOLEY, R.T.; FLYNN, T.; ROTO, T.R.; HIRSCH, MA. Infrequency of isolation of HTLV-III virus from saliva in AIDS. *NEngl JMed.*, 1985, 313:1606.

HOLMSTRUP, P.; WESTERGAARD, J. Periodontal diseases in HIV-infected patients. *J Clin Periodontol.*, 1994, 21: 270–80.

JOHNSON, N.W. Essential questions concerning periodontal diseases in HIV infection. *Oral Dis.*, 1997, 3: suppl. (1): S138-40.

KIM, J.S.; NAG, P.; LANDAY, A.L. et al. Saliva can mediate HIV-1-specific antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, 2006, 48: 267–273.

KOLOKOTRONIS, A.; KIOSES, V.; ANTONIADES, D.; MANDRAVELI, K.; DOUTSOS, I.; PAPANAYOTOU, P. Immunologic status in patients infected with HIV with oral candidiasis and hairy leukoplakia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.*, 1994, 78: 41-6.

KOZIEL, H.; KIM, S.; REARDON, C. et al. Enhanced in vivo human immunodeficiency virus-1 replication in the lungs of human immunodeficiency virus-infected persons with *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.*, 1999, 160: 2048–2055.

LEVI, G.C.; VITÓRIA, M.A. Fighting against AIDS: the Brazilian experience. *AIDS.*, 2002, 16: 2373-2383.

LEVY, J.A.; GREENSPAN, D. HIV in saliva. *Lancet.*, 1988, 2:1248.

LIANG, K-Y & ZEGER, S.L. Longitudinal data analysis using generalized linear models. *Biometrika.*, 1986, 73: 13-22.

LIUZZI, G.; CHIRIANNI, A.; CLEMENTI, M.; BAGNARELLI, P.; VALENZA, A.; CATALDO, P.T, et al. Analysis of HIV-1 load in blood, semen and saliva: evidence for different viral compartments in a cross-sectional and longitudinal study. *AIDS*, 1996, 10:F51-F56.

LINDHE, J. et al. Consensus report: chronic periodontitis. *Ann Periodontol.*, 1999, n. 4, p. 39.

MACHAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. Real-time PCR in Virology. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30 (6): 1292-1305.

MARGIOTTA, V.; CAMPISI, G.; MANCUSO, S.; ACCURSO, V.; ABBADESSA V. HIV infection: oral lesions, CD4 + cell count and viral load in an Italian study population. *J Oral Pathol Med.*, 1999, 28: 173-177.

MATICIC, M.; POLJAK, M.; KRAMAR, B.; TOMAZIC, J.; VIDMAR, L.; ZAKOTNIK, B.; SKALERIC, U. Proviral HIV- 1 DNA in gingival crevicular fluid of HIV-1-infected patients in various stages of HIV disease. *J Dent Res.*, 2000, 79(7): 1496-1501.

MCNEELY, T.B.; DEALY, M.; DRIPPS, D.J.; ORENSTEIN, J.M.; EISENBERG, S.P.; WAHL, S.M. Secretory leukocyte protease inhibitor: a human saliva protein exhibiting anti-human immunodeficiency virus 1 activity in vitro. *J Clin Invest.*, 1995, 96: 456–464.

MELLORS, J.W.; MUNOZ, A.; GIORGI, J.V. et al. Plasma viral load and CD4⁺ lymphocytes as prognostic marker of HIV-1 infection. *Ann Intern Med.*, 1997, 126: 946-954.

MONIACI, D.; GRECO, D.; FLECCHIA, G.; RAITERI, R.; SINICCO, A. Epidemiology, clinical features and prognostic value of HIV-1 related oral lesions. *J Oral Pathol Med.*, 1990, 19: 477-81.

MORRISON, T.B.; WEIS, J.J.; WITTWER, C.T. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques.*, 1998, 24: 954–8.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Quantitative molecular methods for infectious diseases: proposed guidelines. 2001.

NAVAZESH, M.; MULLIGAN, R.; KONO, N.; KUMAR, S.K.S.; NOWICKI, M.; ALVES, M.; MACK, W.J. Oral and systemic health correlates of HIV-1 shedding in saliva. *J Dent Res.*, 2010, 89(10): 1074-1079.

O'BRIEN, W.A.; GROVIT-FERBAS, K.; NAMAZI, A. et al. Human immunodeficiency virus-type 1 replication can be increased in peripheral blood of seropositive patients after influenza vaccination. *Blood.*, 1995, 86: 1082–1089

OGUARIRI, R.M.; BRANN, T.W.; IMAMICHI, T. Hydroxyurea and interleukin-6 synergistically reactivate HIV-1 replication in a latently infected promonocytic cell line via SP1/SP3 transcription factors. *J Biol Chem.*, 2007, 282: 3594–3604.

PAGE, R.C.; EKE, P.I. Case definitions for use in population- based surveillance of periodontitis. *J Periodontol.*, 2007, 78(7 Suppl): 1387–99.

PARRA, B.; SLOTS, J. Detection of human viruses in periodontal pockets using polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol.*, 1996, 5: 289-293.

PATTON, L.L. Sensitivity, specificity, and positive predictive value of oral opportunistic infections in adults with HIV / AIDS as markers of immune suppression and viral burden. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 2000, 90: 182–188.

PERELSON, A.; ESSUNGER, Y.; CAO, Y. et al. Decay characteristics of HIV-1 infected compartments during combination therapy. *Nature.*, 1997, 387: 188-91.

PETITJEAN, G.; BECQUART, P.; TUAILLON, E.; AL TABAA, Y.; VALEA, D.; HUGUET, M.F.; MEDA, N.; VAN DE PERRE, P.; VENDRELL, J.P. Isolation and characterization of HIV-1-infected resting CD4+ T lymphocytes in breast milk. *Journal of Clinical Virology.*, 2007, 39: 1-8.

POGGI, C.; PROFIZI, N.; DJEDIOUANE, A.; CHOLLET, L.; HITTINGER, G.; LAFEUILLADE, A. Long-term evaluation of triple nucleoside therapy administered from primary HIV-1 infection. *AIDS.*, 1999, 13: 1213–20.

QIAamp® Viral RNA Mini Handbook, Third Edition, April 2010. Disponível em: <http://www.qiagen.com>.

RAMIREZ-AMADOR, V.; PONCE-DE-LEON, S.; SIERRA-MADERO, J.; SOTO-RAMIREZ, L.; ESQUIVEL-PEDRAZA, L.; ANAYA-SAAVEDRA, G. Synchronous kinetics of CD4+ lymphocytes and viral load before the onset of oral candidosis and hairy leukoplakia in a cohort of Mexican HIV-infected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2005, 21: 981–990.

REZNIK, D.A. Oral manifestations of HIV disease. *Top HIV Med.*, 2005, 13: 143–148.

RICHARDSON, B.A.; JOHN-STEWART, G.C.; HUGHES, J.P.; NDUATI, R.; MBORI-NGACHA, D.; OVERBAUGH, J. et al. Breast-milk infectivity in human immunodeficiency virus type 1-infected mothers. *J Infect Dis.*, 2003, 187: 736–40.

ROUSSEAU, C.M.; NDUATI, R.W.; RICHARDSON, B.A.; JOHN-STEWART, G.C.; MBORI-NGACHA, D.A.; KREISS, J.K. et al. Association of levels of HIV-1-infected breast milk cells and risk of mother-to-child transmission. *J Infect Dis.*, 2004, 190: 1880–8.

RYDER, M.I. An update on HIV and periodontal disease. *J Periodontol.*, 2002, 73: 1071–1078.

SCHACKER, T.; COLLIER, A.C.; HUGHES, J.; SHEA, T.; COREY, L. Clinical and epidemiologic features of primary HIV infection. *Ann Intern Med.*, 1996, 125: 257–264.

SCHEUTZ, F.; MATEE, M.I.; ANDSAGER, L.; HOLM, A.M.; MOSHI, J.; KAGOMA, C. et al. Is there an association between periodontal condition and HIV infection? *J Clin Periodontol.*, 1997, 24: 580–7.

SHIRAI, A. et al. Human immunodeficiency virus infection induces both polyclonal and virus specific B cell activation. *J Clin Invest.*, 1992, 89: 561–566.

SHUGARS, D.C.; ALEXANDER, A.L.; FU, K.; FREEL, S.A. Endogenous salivary inhibitors of human immunodeficiency virus. *Arch Oral Biol.*, 1999, 44: 445–453.

SHUGARS, D.C.; SLADE, G.D.; PATTON, L.L.; FISCUS, S.A. Oral and systemic factors associated with increased levels of Human Immunodeficiency Virus type 1 RNA in saliva. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 2000, 89:432–440.

SHUGARS, D.C.; PATTON, L.L.; FREEL, S.A. et al. Hyperexcretion of human immunodeficiency virus type 1 RNA in saliva. *J Dent Res.*, 2001, 80: 414–420.

SONJA C.BOY; MARLENE B.,VAN HEERDEN; WOLFAARDT, M.; COCKERAN, R.; GEMA, E.; WILLIE F., VAN HEERDEN. An investigation of the role of oral epithelial cells and Langerhans cells as possible HIV viral reservoirs. *J Oral Pathol Med.*, 2009, 38: 114–119.

SORIANO, V.; GOMES, P.; HENEINE, W. Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) in Portugal. *J Med Virol.*, 2000, 66: 11–6.

STANLEY, S.K.; OSTROWSKI, M.A.; JUSTEMENT, J.S. et al. Effect of immunization with a common recall antigen on viral expression in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med.*, 1996, 334: 1222–1230.

STAPRANS, S.I.; HAMILTON, B.L.; FOLLANSBEE, S.E. et al. Activation of virus replication after vaccination of HIV-1- infected individuals. *J Exp Med.*, 1995, 182: 1727–1737.

THE BREASTFEEDING AND HIV INTERNATIONAL TRANSMISSION STUDY GROUP. Late postnatal transmission of HIV-1 in breast-fed children: an individual patient data meta-analysis. *J Infect Dis.*, 2004, 189: 2154–66.

UNAIDS/WHO, Joint United Nations Programme on HIV/AIDS/World Health Organization. AIDS epidemic update: December 2007.

UNAIDS 2008. Report on the global HIV/AIDS epidemic

VERNON, L.T.; DEMKO, C.A.; WHALEN, C.C.; LEDERMAN, M.M.; TOOSSI, Z.; WU, M.; HAN, Y.W.; WEINBERG, A. Characterizing traditionally defined periodontal disease in HIV+ adults. *Community Dent Oral Epidemiol.*, 2009, 37: 427–437.

ZEGER, S.L. & LIANG, K-Y. Longitudinal data analysis for discrete and continuous outcomes. *Biometrika.*, 1986, 42 (1): 121-130.

8 - ANEXOS

ANEXO 1

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA /FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROJETO DE PESQUISA EM PERIODONTIA**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado Senhor e Senhora,

A pesquisa da qual está sendo convidado(a) a participar, intitulada “Risco de desenvolver doença periodontal em adultos infectados pelo HIV em atendimento num Hospital Universitário do Rio de Janeiro: um estudo de coorte prospectivo”, visa identificar e caracterizar as doenças que afetam as **gengivas e o osso** que suportam os dentes na boca, denominadas **DOENÇAS PERIODONTAIS**, em pacientes infectados pelo HIV. As doenças periodontais são infecções causadas pelo **acúmulo de bactérias** específicas presentes na **placa dental bacteriana** localizada abaixo da gengiva, o que leva a uma inflamação e possível perda do dente. Esta doença afeta principalmente adultos, mas também pode ocorrer em indivíduos jovens e em crianças. Ela se manifesta pela inflamação da gengiva, com sangramento e vermelhidão gengival, presença de tártaro e placa dental (massa branca aderida ao dente), dor, presença ou não de pus e mobilidade (“amolecimento”) do dente. Além das bactérias, outros fatores podem favorecer o aparecimento desta doença, como fumo, stress, diabetes, a composição genética e a infecção pelo HIV. Alguns indivíduos possuem **genes específicos** no seu cromossomo que podem aumentar sua chance de desenvolver a doença. Por isso, este estudo irá avaliar as bactérias encontradas na placa dental e alguns genes específicos que possam ter alguma influência nessas doenças numa população soropositiva para o HIV. Para participar dele é necessário ter saúde periodontal ou apresentar uma doença periodontal leve a moderada (**sangramento, vermelhidão e inchaço da gengiva, dente amolecido, dor, presença de tártaro**), não estar grávida nem amamentando, estar com boa saúde geral, não ter tido tratamento para as gengivas ou ter tomado antibióticos nos últimos 6 meses. O protocolo da pesquisa envolve inicialmente um **exame clínico oral** (exame da gengiva e dentes para avaliar inflamação e presença de placa dental ou tártaro) e radiográficos de todos os dentes. Além disso, a **placa dental bacteriana** será removida com uma cureta periodontal estéril (usada para remoção de tártaro) de alguns dentes. A saliva (que contém grandes quantidades de células da bochecha) também será coletada num recipiente plástico para a identificação dos genes específicos do paciente. Os indivíduos selecionados que aceitarem participar desse estudo receberão **tratamento periodontal gratuito**, consistindo de limpeza dos dentes para remoção da placa dental e tártaro, e controle da higiene. Este estudo terá a duração de 4 anos e envolverá de 6-12 visitas de aproximadamente 1 hora, sendo que haverá acompanhamento a cada 3 meses após o tratamento. Todos os exames e tratamento serão feitos com material estéril e equipamento odontológico adequados num consultório pertencente ao Hospital Clementino Fraga Filho da UFRJ, pelo pesquisador responsável. Pacientes que necessitarem de outros tratamentos serão encaminhados às diferentes especialidades da Clínica da Faculdade de Odontologia da UFRJ. Os procedimentos deste estudo envolvem exames clínicos e tratamento de gengiva que são normalmente realizados no consultório dentário e não implicam em nenhum risco maior ao paciente. Além disso, cada participante responderá um questionário amplo sobre saúde em geral, hábitos alimentares e diferentes aspectos de saúde bucal, que levará aproximadamente 30 minutos. Os participantes terão como benefício o tratamento odontológico por profissionais especializados, sem custos, assim como um melhor conhecimento do seu estado de saúde oral e geral. Os resultados de seus exames serão confidenciais e estarão disponíveis para quando você quiser requisitá-los. Os dados desta pesquisa poderão ser apresentados em congressos ou publicados em revistas especializadas, mas a identidade dos participantes será sempre preservada. Finalmente, você estará à vontade para não participar desse estudo ou desistir de continuar, a qualquer momento, sem prejuízo ao seu tratamento. Portanto, uma vez tendo lido e entendido tais esclarecimentos, solicitamos que você date e assine esse formulário de consentimento. Em caso de dúvida, durante todo o estudo, você terá acesso ao profissional responsável (**Lucio de Souza Gonçalves**) que pode ser encontrado no endereço Rua Dois de Dezembro, 78, 913, Flamengo, telefones (21) 2205-3425 ou 9455-0040.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações sobre o estudo acima citado que li ou que foram lidas para mim.

Nome/assinatura do paciente

Rio de Janeiro, ___/___/___.

Nome/assinatura do pesquisador

Rio de Janeiro, ____/____/____.

ANEXO 2

FICHA DE ANAMNESE

Nome: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ Cep: _____ Data de Nascimento: ____/____/____

Sexo: () Masc. () Fem. Nacionalidade/Naturalidade: _____ Estado Civil: _____

Raça: _____ Tel: _____

Pesquisador nas Perguntas sobre escolaridade preencher:

1= Analfabeto/lê-escreve 3= 1º grau completo 5=2º grau completo

2= 1º grau incompleto 4= 2º grau incompleto 6= 3º grau incompleto/completo

Escolaridade:

Quantos cômodos existem na casa:

Quantas pessoas residem na moradia?

Renda familiar (marcar em salários mínimos):

A. INFORMAÇÕES MÉDICAS

1- Nome do seu médico:

Telefone: _____

2- Data do seu último exame médico: ____/____/____.

3- Você já foi hospitalizado(a)? _____ () Sim () Não () Não Sei

4- Em caso de resposta positiva, qual o motivo? _____

5- Você está sob cuidados médicos? _____ () Sim () Não () Não Sei

6- Em caso de resposta positiva, qual o motivo? _____

7- Você tem ou já teve algumas das seguintes condições:

a- Doenças congênitas do coração? _____ () Sim () Não () Não Sei

b- Doenças cardíacas (ex.: infarto, angina, derrame, pressão alta, pressão baixa)?

() Sim () Não () Não Sei

- Respiração difícil quando deitado ou sem fazer esforço físico?_____ () Sim () Não () Não Sei
- Inchaço nos pés ou nos tornozelos?_____ () Sim () Não () Não Sei
- Dor, pressão ou mal estar no peito?_____ () Sim () Não () Não Sei
- c- Febre reumática?_____ () Sim () Não () Não Sei
- d- Endocardite bacteriana? _____ () Sim () Não () Não Sei
- e- sopro no coração? _____ () Sim () Não () Não Sei
- f- Desmaios, convulsões ou epilepsia_____ () Sim () Não () Não Sei
- g- Dor de cabeça freqüente (2 ou mais por semana)?_____ () Sim () Não () Não Sei
- h- Tratamento com neurologista?_____ () Sim () Não () Não Sei
- i- Problemas pulmonares (ex.: tuberculose, asma, enfisema, bronquite)?_____ () Sim () Não () Não Sei
- j- Hepatite, outras doenças hepáticas, icterícia?_____ () Sim () Não () Não Sei
- k- Artrite ou dores articulares?_____ () Sim () Não () Não Sei
- l- Doenças sexualmente transmissíveis (ex.: sífilis, gonorréia, AIDS)?_____ () Sim () Não () Não Sei
- m- Diabetes?_____ () Sim () Não () Não Sei
- Demora na cicatrização dos ferimentos?_____ () Sim () Não () Não Sei
- Você urina mais de 6 vezes por dia?_____ () Sim () Não () Não Sei
- Você sente sede a maior parte do tempo?_____ () Sim () Não () Não Sei
- n- Problemas sangüíneos (ex.: anemia, fragilidade capilar, coagulação, sangramento, hemoptise, melena, hematemese, hematúria, epistaxes)?_____ () Sim () Não () Não Sei
- o- Úlceras ou outros problemas estomacais?_____ () Sim () Não () Não Sei
- p- Reação alérgica a: anestésicos, antibióticos (ex.: penicilina, tetraciclina), sulfa, analgésicos, anti-inflamatórios, tranqüilizantes, outros (ex.: alimentos, iodo, poeira)?_____ () Sim () Não () Não Sei
- q-Em caso de resposta positiva, qual(is) substância(s) você é alérgico?_____
- _____
- 8- Você já foi submetido à transfusão sangüínea?_____ () Sim () Não () Não Sei
- 9- Você está tomando algum medicamento (listar mais adiante)?_____ () Sim () Não () Não Sei
- 10- Você teve alguma redução acentuada do seu peso?_____ () Sim () Não () Não Sei
- 11- Você teve alguma alteração recente no seu apetite?_____ () Sim () Não () Não Sei
- 12- Você foi submetido à radioterapia?_____ () Sim () Não () Não Sei

13- Você já foi submetido a tratamento para (marcar 1 = sim; 2 = não; e 3 = não sabe)

DOENÇA		DOENÇA	
Hipertrofia de parótidas		Impetigo	
Doença renal		Estrófila	
Síndrome nefrótica		Eczema Seborréico	
Amigdalite		Osteomielite	
Diarréia		Déficit de crescimento	
Monilíase		Retinite (CMV, toxoplasmose)	
Otite		Articulação (artrite)	
Infecção respiratória		Distúrbios emocionais	
Problemas gastrointestinais		Hipertensão	
Pneumonia		Cardiopatas	
Escarlatina		Diabetes	
Hemoglobinopatia		Colagenoses	
Febre		Anemia	
Herpes labial		Hepatite	
Herpes Zoster		Alergia respiratória	
Gengivostomatite Herpética		Aftas	
Retardo mental		Trombocitopenia	
Doença metabólicas		Leucopenia	
Encefalopatia		Agranulocitose	
Neuropatia periférica		Retardo do desenv. psicomotor	

Outros _____

14- Gravidez _____ () Sim () Não () Não Sei

- Em caso de resposta positiva, há quantos meses? _____
- Você já passou pela menopausa? _____ () Sim () Não () Não Sei
- Você está tomando algum hormônio? _____ () Sim () Não () Não Sei

15- Hábitos:

Fumo ☐

(1- não; 2- de 1 a 10 cig. P/ dia; 3- de 10 a 20 cig. P/dia; 4- + de 20 cig. P/dia)

Caso seja ex-fumante, informe:

Há quanto tempo parou?_____ Quanto tempo fumou?_____ Quantos cigarros fumava?_____

Álcool

☐

(1- sim; 2- não)

Consumo diário: _____

Drogas

(1- sim; 2- não; 3- injetáveis)

☐

16- Você tomou algum medicamento nos últimos dias?

(1- sim ; 2- não)

☐

Se a resposta for positiva, quais os medicamentos que você utilizou nos últimos 90 dias?

MEDICAMENTO	POSOLOGIA

Quando você fez exame p/ o HIV ? _____

(colocar a data)

Por que você fez o teste da AIDS ? _____

B. INFORMAÇÕES ODONTOLÓGICAS

- 1- Queixa principal: _____
- 2- Nome do seu dentista: _____ Telefone: _____
- 3- Frequência de visitas ao dentista: _____
- 4- Data da última visita ao dentista: _____
- 5- Sua gengiva sangra? _____ () Sim () Não () Não Sei
- 6- Você já teve abscesso periodontal ou GUNA? _____ () Sim () Não () Não Sei
- 7- Você já foi submetido a tratamento periodontal? _____ () Sim () Não () Não Sei
- 8- Em caso de resposta positiva:
- Qual? _____ Quando? _____
- 9- Você já foi submetido a tratamento ortodôntico? _____ () Sim () Não () Não Sei
- 10- Em caso de resposta positiva:
- Qual? _____
 - Quando? _____ Duração do tratamento? _____
- 11- Você já foi submetido a tratamento endodôntico? _____ () Sim () Não () Não Sei
- Em caso de resposta positiva, informar a data do tratamento: _____
- 12- Você usa ou já usou alguma prótese dentária? _____ () Sim () Não () Não Sei
- Em caso de resposta positiva, informar o tempo de duração da prótese em uso: _____
- 13- História Familiar:
- Alguém em sua família tem ou teve doença periodontal? _____ () Sim () Não () Não Sei
 - Alguém em sua família teve perda precoce dos dentes? _____ () Sim () Não () Não Sei
 - Em caso de resposta positiva, citar quem e possíveis causas: _____
- 14- Você costuma respirar pela boca? _____ () Sim () Não () Não Sei
- 15- Você range os dentes? _____ () Sim () Não () Não Sei
- 16- Quantas vezes você escova os dentes por dia? _____
- 17- Alguém já lhe ensinou a escovar os dentes? _____ () Sim () Não () Não Sei
- 18- Você usa fio dental? _____ () Sim () Não () Não Sei
- 19- Você usa ou já usou algum medicamento para de problemas dentários? _____ () Sim () Não () Não Sei
- 20- Em caso de resposta positiva, informe qual medicamento, quando usou e as condições que levou ao uso: _____
- _____

ANEXO 3



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
Faculdade de Medicina
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Coordenador:
☒ Alice Helena Dutra Violante
Médico - Prof. Associada
Secretário:
☒ Zumará Rodrigues da Silva
Professora
Membros Titulares:
☐ Beatriz Maria Alasia de Herédia
Médico - Prof. Associada
☐ Eduardo Jorge Bastos Côrtes
Médico - Prof. Assistente
☐ Eliza Regina Ambrosio
Assistente Social - Mestre
☒ Helena Wazynsky
Representante dos Usuários
☐ Luiz Carlos Duarte de Miranda
Médico - Prof. Adjunto
☐ Luzia da Conceição de Araújo Marques
Enfermeiro - Mestre
☒ Paulo Feijó Barros
Médico - Prof. Adjunto
☒ Regiane de Fátima Rivelli
Farmacêutica Doutoranda
☐ Roberto Coury Pedrosa
Médico - Doutor
☐ Mario Teixeira Antonio
Farmacêutico - Especialista
Membros Suplentes
☐ Anna Paola Trindade Rocha Perucci
Nutricionista - Professor Adjunto
☐ Beatriz Moritz Trope
Médico - Doutora
☒ Carlos Alberto Guimarães
Médico - Prof. Adjunto
☐ Cecília de Assis Martinusso
Jornalismo
☒ Lucia Helena Luiza Vieira
Aminim
Médico - Mestre - Doutoranda
☐ Maria da Conceição Zacharias
Médico - Professor Assistente
☐ Maria de Fátima Gustavo Lopes
Representante dos Usuários
☐ Mariângela Oliveira da Silva
Enfermeiro
☒ Márcio Fernando Petzhold
Engenheiro - Doutor
☐ Orlando Nunes Cosenza
Sociólogo - Doutor
☒ Rui Haddad
Médico - Prof. Adjunto
☐ Vania Dias de Oliveira
Assistente Social

CEP - MEMO - n.º 746/07

Rio de Janeiro, 19 de setembro de 2007.

Da: Coordenadora do CEP

A (o): Sr. (a) Pesquisador (a): Dr. Lucio de Souza Gonçalves

Assunto: Parecer sobre projeto de pesquisa.

Sr. (a) Pesquisador (a),

Informo a V. S.a. que o CEP constituído nos Termos da Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e, devidamente registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, recebeu, analisou e emitiu parecer sobre a documentação referente ao protocolo e seu respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme abaixo discriminado:

Protocolo de Pesquisa: 054/07 - CEP

Título: "Risco de desenvolver doença periodontal em adultos infectados pelo HIV em atendimento num Hospital Universitário do Rio De Janeiro: um estudo de coorte prospectivo".

Pesquisador (a) responsável: Dr. Lucio de Souza Gonçalves

Data de apreciação do parecer: 26/07/2007

Parecer: "APROVADO."

Informo ainda, que V. Sa. deverá apresentar relatório semestral, previsto para 26/01/2008, anual e/ou relatório final para este Comitê acompanhar o desenvolvimento do projeto. (item VII. 13.d., da Resolução n.º 196/96 - CNS/MS).

Atenciosamente,

Prof.ª Alice Helena Dutra Violante
Coordenadora do CEP

Mario Teixeira Antonio
Coordenador Substituto do CEP

Dentes		18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
IP	MV																
	V																
	DV																
	ML																
	L																
	DL																
IG	MV																
	V																
	DV																
	ML																
	L																
	DL																

Dentes		38	37	36	35	34	33	32	31	41	42	43	44	45	46	47	48
IP	MV																
	V																
	DV																
	ML																
	L																
	DL																
IG	MV																
	V																
	DV																
	ML																
	L																
	DL																

IP = Índice de Placa

%

IG = Índice Gengival

%

PBS = Profundidade de Bolsa à Sondagem

NCI = Nível Clínico de Inserção

DIAGNÓSTICO:

PLANO DE TRATAMENTO PERIODONTAL

[illegible]

DATA:

	/		/
--	---	--	---

PACIENTE: concorda com o plano de tratamento?

FICHA DE EVOLUÇÃO

[illegible]