

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Centro de Ciências da Saúde
Faculdade de Odontologia

ELAINE LIMA DE AMORIM

**FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Candida* spp. ISOLADAS DA
CAVIDADE BUCAL DE CRIANÇAS INFECTADAS PELO HIV**

Rio de Janeiro
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Centro de Ciências da Saúde
Faculdade de Odontologia

**FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Candida* spp. ISOLADAS DA
CAVIDADE BUCAL DE CRIANÇAS INFECTADAS PELO HIV**

ELAINE LIMA DE AMORIM

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Odontologia (Área de Concentração: Odontopediatria) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia (Área de Concentração: Odontopediatria).

Orientadoras:

Profa. Dra. Gloria Fernanda Barbosa de Araújo Castro

Profa. Adjunta do Dep. de Odontopediatria e Ortodontia – FO/UFRJ

Profa. Dra. Maristela Barbosa Portela

Profa. Adjunta do Dep. De Odontoclínica – FO/UFF/Niterói

Ficha catalográfica

Amorim, Elaine Lima de.

Fatores de virulência de *Candida spp.* isoladas da cavidade bucal de crianças infectadas pelo HIV / Elaine Lima de Amorim. – Rio de Janeiro : UFRJ/FO, 2014.

xviii, 81 f.: il.; 31 cm.

Orientadores: Gloria Fernanda Barbosa de Araújo Castro e Maristela Barbosa Portela.

Dissertação (mestrado) -- UFRJ/FO, Programa de Pós-graduação em Odontopediatria, 2014.

Referências bibliográficas: f. 86-94.

1. Candida - patogenicidade. 2. Candidíase Bucal - microbiologia. 3. Boca - microbiologia. 4. Saliva. 5. Infecções por HIV. 6. Biofilmes. 7. Fatores de Virulência. 8. Fosfolipases - biossíntese. 9. Farmacorresistência Fúngica. 10. Fluconazol. 11. Crianças - Tese. I. Castro, Gloria Fernanda Barbosa de Araújo. II. Portela, Maristela Barbosa III. Universidade Federal do Rio de Janeiro/FO, Programa de Pós-graduação em Odontopediatria. IV. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

DE AMORIM, ELAINE LIMA

“FATORES DE VIRULÊNCIA DE CANDIDA SPP. ISOLADAS DA CAVIDADE BUCAL DE CRIANÇAS INFECTADAS PELO HIV”

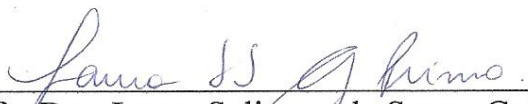
Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Odontologia (Odontopediatria).

Rio de Janeiro, 29 de janeiro de 2014.



Profª. Dra. Ivete Pomarico Ribeiro de Souza

DO-Profª. Titular do Dept^o de Odontopediatria e Ortodontia da UFRJ



Profª. Dra. Laura Salignac de Souza Guimarães Primo

DO-Profª. Adjunta do Dept^o de Odontopediatria e Ortodontia da UFRJ



Profª. Dra. Carla Martins de Oliveira

DO-Profª. Adjunta do Dept^o de Odontopediatria e Ortodontia da UFRJ

DEDICATÓRIA

À minha mãe querida, que é um grande presente de Deus na minha vida. Muito obrigada pelo amor incondicional, pelo apoio em meus desafios e por me incentivar a perseguir os meus sonhos. A senhora me fez entender o que é amor. Te amo, mãe!

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido **Deus Eterno**, que é o meu melhor amigo. Muito obrigada, Senhor, por sempre estar ao meu lado. Tu és Eterno, eu tão fugaz... Tu és grande, eu tão pequena. Tu és perfeito, eu tão falha. Ainda assim me amas! Não tenho palavras para expressar minha gratidão a Ti! Eu te amo!

Obrigada, Senhor, por ter me dado o meu pai **Jadiel**. Embora ele já esteja em Teu descanso, seus ensinamentos e exemplo permanecem em meu coração e memória.

À minha mãe querida **Edith**. Deus não poderia ter escolhido alguém melhor para me gerar e me ensinar. Obrigada por abdicar de tantas coisas em meu favor. Desde noites de sono até sonhos renunciados simplesmente por amor a mim. Obrigada pelos dengos, pelo cuidado, pelas correções, pelo incentivo... por tudo! Louvo a Deus por me dar a melhor mãe do mundo! Eu te amo demais!

Às minhas irmãs **Fabiani e Elisangela** e irmãos **Wilkerson e Wanderson**. Sou muito feliz por ter tido o privilégio de compartilhar a minha vida com pessoas tão especiais como vocês. Eu não seria tão completa se não os tivesse em minha vida. Saibam que podem contar comigo. Amo vocês, meus irmãos!

Aos meus cunhados **André e Nilton** e minhas cunhadas **Sheyla e Rafaela**. Obrigada pelo apoio, compreensão e palavras de incentivo nesta jornada. Vocês moram no meu coração!

Aos meus sobrinhos **Jade, Hélène, Guilherme, Patrick, Isabele e Larissa**. Obrigada por me divertirem tanto com o seu jeito meigo, sincero e espontâneo. Amo vocês demais!

A todos os meus familiares e amigos pelo apoio e incentivo durante as etapas desta caminhada. Obrigada por dividirem a carga nesta jornada! Perdão pela ausência durante este período.

A meus irmãos e amigos da minha igreja do coração **Igreja Evangélica Congregacional da Paulicéia**. Obrigada pelo carinho, apoio, orações e palavras de encorajamento. Vocês são minha segunda família!

As minhas amigas **Adílis Alexandria, Camila Nassur, Érika Caldeira e Josiane Lapoente**. Vocês trazem muita alegria ao meu coração. Que nossa amizade resista ao tempo e à distância. Amo vocês!

Às minhas orientadoras, **Profa. Dra. Gloria Fernanda Barbosa de Araújo Castro e Profa. Dra. Maristela Barbosa Portela**. Saibam que desde a minha especialização admiro muito o seu trabalho e dedicação no tratamento de crianças necessidades especiais e por realizarem pesquisas para contribuírem com sua qualidade de vida. Este é um trabalho nobre que vocês têm desenvolvido de maneira admirável. Agradeço pela oportunidade de ter realizado este trabalho com vocês, pela confiança depositada e por compartilharem seu conhecimento comigo durante esse tempo. Vocês são admiráveis!

Aos professores da Odontopediatria, que colaboraram o meu crescimento profissional...

Profa. Dra. Ivete Pomarico Ribeiro de Souza e Prof. Rogério Gleiser, por compartilharem todo seu conhecimento comigo e com meus colegas. Nossos seminários foram muito recompensadores. Vocês são exemplos de dedicação e profissionalismo.

Profa. Dra. Laura Salignac de Souza Guimarães Primo e Profa. Dra. Lucianne Copple Maia, pelo convívio durante este período; pelo carinho e palavras de incentivo dirigidas a mim. Muito obrigada.

Prof. Marcelo Costa, pelo carinho e pela oportunidade de participar da supervisão de clínica da disciplina eletiva Odontopediatria II. Essa foi uma experiência maravilhosa e inesquecível! Muito obrigada por sempre tratar seus alunos com gentileza e carinho!

Prof. João Farinhas, um querido amigo! Obrigada pelo apoio desde a minha especialização até hoje. Obrigada pelo convívio e orientação nas clínicas e pela

oportunidade de ter feito parte de sua equipe no curso de sedação consciente. Obrigada por tudo, João!

Prof. Luís Eduardo. Obrigada por compartilhar sua experiência clínica comigo durante a minha especialização e mestrado. Seu jeito imprevisível e seu senso de humor tornaram as clínicas muito mais divertidas! Obrigada por tudo, Eduardo!

Profas. Nena, Fátima e Vanessa. Posso dizer que são responsáveis por eu estar hoje na odontopediatria, pois me fizeram perceber esta vocação ainda durante a graduação. O tempo passou e a minha admiração por vocês só aumentou. Muito obrigada por tudo!

Profs. Marta, Rosana, Barbara, Andréa Antonio, Thomaz Chianca e Aline Neves. Muito obrigada pelos ensinamentos, convívio harmonioso e gentileza durante esses anos. Sou muito grata a vocês!

À **Profa. Rosângela**, pelo acolhimento no seu laboratório, pela confiança e incentivo, tornando possível a realização deste trabalho.

À professora **Carla Martins** e ao aluno do doutorado **Marlus Cajazeira**, meus “vizinhos”. Foi muito bom compartilhar de sua companhia nas idas e vindas dessa jornada. Vocês são um exemplo para mim!

Alexandre, Anna Léa, Daniel e Geisa, companheiros de laboratório. Obrigada pelo apoio e convivência agradável que tornaram o ambiente laboratorial mais alegre e todos os experimentos mais simples.

À amiga **Ariadne Nunes**. Passamos juntas pela nossa primeira disciplina do mestrado e enfrentamos desafios (MIC e Gel) que colaboraram com o crescimento de nossa amizade. Obrigada, Ari! Você mora no meu coração.

À **técnica de laboratório Fatima**, por ter me ensinando a trabalhar com meios de cultura tão sensíveis. Obrigada por ser solícita, sem mesmo me conhecer. Você é uma referência para mim.

Às colegas de turma, **Helena, Nashalie, Queila e Tacíria**, obrigada pelo convívio e por compartilharem os momentos dessa caminhada. Desejo a vocês muito sucesso! Queila e Tacíria, vocês são grandes amigas que este mestrado me deu. Sou muito feliz pela nossa amizade. Sentirei falta deste convívio diário.

Às amigas veteranas, **Christiane, Thais Alves e Thais Soares**. Obrigada pelo ótimo convívio durante todo o primeiro ano deste curso. Cada uma de vocês tem um lugar especial em meu coração.

Aos amigos queridos da turma do primeiro ano, **Adrielle, Clarissa, Livia, Marina e Thiago**. Obrigada pela amizade, apoio e incentivo nesta reta final. Vocês são maravilhosos e merecem tudo de melhor. Sentirei saudades.

Aos alunos do doutorado **Tatiana Kelly, Marcello Rotter, Ticiana Sabóia, Michele Lenzi, Michelle Ammari, Andréa Pintor e Valéria Bastos**, pela amizade e companhia.

À doutora **Cristiana Aroeira** pela companhia durante o meu primeiro ano e pelo incentivo e carinho dirigidos a mim. Muito obrigada, Cris!

Às alunas de iniciação científica **Ana Clara, Natália, Raquel e Thais**, pela dedicação e empenho.

À **Andréa, Gina, Kátia e Mere**, pela amizade e companheirismo não só durante o mestrado, mas também durante a especialização. Vocês são maravilhosas!

Às recepcionistas **Bebel e Rose**, pela ajuda e bom humor durante este período. Vocês são ótimas.

Ao **Robson, Zezé, João Carlos, Luíza, Edinaldo e Patrícia** pelo convívio maravilhoso, pela disposição e alegria em me ajudar. Muito obrigada por tudo.

Aos queridos pacientes pelo carinho e ternura dedicados a mim e todos que participaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

À **CAPES e FAPERJ** pelo apoio financeiro durante o curso de Mestrado.

“Até que o sol não brilhe, acendamos uma vela na escuridão”.

Confúcio

RESUMO

AMORIM, ELAINE LIMA DE. **FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Candida* spp. ISOLADAS DA CAVIDADE BUCAL DE CRIANÇAS INFECTADAS PELO HIV.** Rio de Janeiro, 2014. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de concentração: Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Candida spp. são responsáveis por infecções graves em indivíduos imunossuprimidos. Diversos fatores de virulência contribuem para sua transição de comensais a patógenos, como a formação de biofilme, produção de fosfolipase, produção de protease e a resistência a antifúngicos. O objetivo deste estudo *in vitro* foi avaliar a formação de biofilme, produção de fosfolipase e protease e a susceptibilidade ao Fluconazol de isolados *Candida* spp., provenientes da saliva de crianças infectadas pelo HIV (Grupo HIV) e crianças saudáveis (Grupo controle). Também estes fatores foram correlacionados com o uso do HAART, estado imunológico, presença de AIDS e carga viral do grupo HIV. Foi analisado um total de 79 isolados, sendo 48 isolados de *C. albicans* (33/15) e 20 isolados do complexo *C. parapsilosis lato sensu* (12/8) dos grupos HIV e controle, respectivamente, e isolados de *C. krusei* (8), *C. tropicalis* (1), *C. dubliniensis* (1) e *C. guilliermondii* (1) do grupo HIV. Dados médicos e laboratoriais (CD4%, carga viral) foram coletados dos respectivos prontuários médicos. A formação de biofilme foi avaliada pela redução do XTT. Isolados de cada espécie com a habilidade de formar maior quantidade de biofilme maduro (grupo HIV) foram submetidos à microscopia confocal de fluorescência para a visualização da morfologia e estrutura do biofilme. As análises da produção de fosfolipase e protease se deram por meio da metodologia de placas de ágar de gema de ovo e Albumina de Soro Bovino, respectivamente. A susceptibilidade ao Fluconazol foi determinada por meio da técnica de microdiluição. Todos os isolados formaram biofilme (n= 79) e quantitativamente, esta formação foi semelhante em ambos os grupos (p>0.05). A formação de biofilme dos isolados de *C. albicans* foi maior do que a dos isolados de *Candida* não-*albicans* (p<0.05). A atividade de fosfolipase foi detectada em 40,5% (32/79) de todos os isolados e foi significativamente maior no grupo HIV (p=0.006) e nos isolados de *C. albicans* deste grupo (p=0,007). A atividade de protease foi detectada em 66 isolados (84,8%) e em ambos os grupos a maioria era produtor relativamente forte ou muito forte. Trinta e três (33/41, 7%) isolados eram resistentes ao Fluconazol, sendo 42,9% do grupo HIV e 39,1% do grupo controle. Não foi observada correlação entre a expressão dos fatores de virulência e os dados médicos relativos ao grupo HIV. No entanto, a expressão dos fatores de virulência dos isolados orais de *Candida* spp. de crianças infectadas pelo HIV se mostrou acentuada. Este achado pode destacar o papel da imunossupressão na regulação da expressão dos fatores de virulência de *Candida* spp.

DESCRITORES: *Candida*, crianças infectadas pelo HIV, fatores de virulência, biofilmes, fosfolipases, antifúngicos.

SUMMARY

AMORIM, ELAINE LIMA DE. **FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Candida* spp. ISOLADAS DA CAVIDADE BUCAL DE CRIANÇAS INFECTADAS PELO HIV.** Rio de Janeiro, 2014. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de concentração: Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Candida species are responsible for life threatening infections in severely immunocompromised individuals. Several virulence attributes support their transition from commensal to parasite, as the biofilm formation, secretion of phospholipase, protease and the resistance to antifungals. The aims of this study were to assess the *in vitro* biofilm formation, phospholipase production, protease production and the susceptibility to Fluconazole of *Candida* spp. recovered from the saliva of HIV infected children and controls. Also, to correlate these features with the use of HAART, immunological status, presence of AIDS and viral load of HIV group. A total of 79 isolates were analyzed: 48 *C. albicans* isolates (33/15) and 20 *C. parapsilosis sensu lato complex* isolates (12/8) from HIV and control patients, respectively, while *C. krusei* (8), *C. tropicalis* (1), *C. dubliniensis* (1) and *C. guilliermondii* (1) from HIV patients only. Medical data was collected, considering antiretroviral therapy, CD4 count and viral load. The biofilm forming ability was analyzed through the XTT reduction assay technique. Representative isolates of each specie with the ability to form more quantity of mature biofilm (HIV group) underwent confocal laser scanning microscopy for the visualization of biofilm morphology and structure. Phospholipase and protease assays were performed through the egg yolk and Bovine Serum Albumin agar plate methods, respectively. Fluconazole susceptibility was determined through the microdilution assay. All isolates were able to form biofilm (n= 79). Quantitatively, *Candida* isolates from HIV-positive and negative children presented similar ability to form biofilm (p>0.05). In *C. albicans* isolates from both, HIV and control groups, the biofilm formation was higher than in non-*albicans Candida* isolates (p<0.05). Phospholipase activity was detected in 40.5% (32/79) of all isolates. Its activity was significantly higher in HIV group (p=0.006) and *C. albicans* isolates from HIV group (p=0.007). Protease activity was detected in 66 isolates (84.8%) and most of them from both groups were relatively/very strong producers. Thirty three (33/41.7%) of all isolates were resistant to Fluconazole. Most non-*albicans Candida* isolates from HIV (87.0%) and control (87.5%) groups were susceptible to this drug. No significant difference was detected between groups in biofilm, protease and Fluconazole susceptibility assays. Correlation with medical data in HIV group was not found. *Candida* spp. isolates of HIV-positive children present increased virulence expression due to significant higher *in vitro* phospholipase production. This finding may enlighten the relevant role played by immunosuppression in the modulation of *Candida* virulence attributes.

Key Words: *Candida*, HIV-infected children, virulence factors, biofilm formation, phospholipases, fungal drug resistance.

LISTA DE FIGURA

Figure 1: Confocal scanning laser microscopy of *Candida* spp. biofilms..... 53

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Table 1: Biofilm production categorization among different *Candida* species from HIV and Control Groups.....51

Table 2: Association between *C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. krusei* biofilm formation and medical data from HIV group52

Artigo 2

Table 1: Medical and personal data from HIV and Control Groups..... 70

Table 2: Distribution and characterization of phospholipase production, protease production and susceptibility to Fluconazole of HIV and Control groups *Candida* spp. isolates..... 71

Table 3: Distribution of *Candida* spp. isolates according to their species and phospholipase production, protease production and Fluconazole susceptibility categorization.....72

LISTA DE ABREVIATURAS

- AIDS Acquired Immunodeficiency Syndrome
- AIDS Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- ATCC American Type Culture Collection
- BHI Brain Heart Infusion

- CD Cirurgiã-dentista
- CD4 CD4 lymphocytes
- CD4 Linfócitos T-CD4
- CD4/CD8 Relação Linfócito T CD4 e CD8
- CD8 CD8 lymphocytes
- CD8 Linfócitos T-CD8
- cells/ml Cells per milliliter
- céls/ml Células por mililitro
- CEP Comitê de Ética em Pesquisa
- CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute
- CLSM Confocal Laser Scanning Microscopy
- h hora
- HIV Vírus da Imunodeficiência Humana
- HIV Human Immunodeficiency Vírus
- HAART Highly Active Antiretroviral Therapy
- HAART Terapia Múltipla Combinada com Antiretrovirais e Inibidores de Proteases

- IC Intervalo de Confiança
- IPPMG Instituto de Pediatria e Puericultura Martagão Gesteira
- ml Mililitro
- ml/min Mililitro por minuto
- mM Mili molar
- n Number
- n Número
- NCCLS National Committee on Clinical Laboratory Standards
- OD Optical Density

- págs Páginas
- PBS Phosphate Buffer Solution
- PM *Post Meridiam*
- UFRJ Universidade Federal do Rio de Janeiro
- USA United States of America
- χ^2 Chi-squared
- XTT 2, 3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-Carboxanilida
- YCB Yeast Carbon Base
- YNB Yeast Nitrogen Base

LISTA DE SÍMBOLOS

kDa	quilodalton
μ l	Microlitro
μ l/ml	Microlito por mililitro
ml/min	Mililitro por minuto
nm	Nanômetros
rpm	Rotações por minuto
xg	Gramas-força
<i>Pz</i>	Zona de precipitação
<i>Pz</i>	Precipitation Zone
\pm	Mais ou menos
>	Maior que
<	Menor que
\geq	Maior igual que
\leq	Menor igual que
%	Porcentagem
$^{\circ}$ C	Graus Celsius
®	Marca registrada
™	Trade Mark

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. PROPOSIÇÃO.....	28
2.1. OBJETIVO GERAL	28
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3. DELINEAMENTO DA PESQUISA	30
4. DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA.....	36
4.1 Artigo 1.....	36
4.2 Artigo 2	54
5. DISCUSSÃO	73
6. CONCLUSÕES.....	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
8. ANEXOS.....	95

1. INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus HIV é uma epidemia que acomete mais de 35,3 milhões de pessoas em todo o mundo (UNAIDS, 2013). O HIV-1, principal subtipo do vírus, apresenta genoma composto por 9 genes que codificam cerca de 15 proteínas. Devido a modificações químicas pós-traducionais, mais de 2500 interações entre proteínas humanas e o vírus HIV-1 foram identificadas. Geralmente, essas interações têm como objetivo o benefício do vírus através da utilização dos mecanismos da célula humana (BALAKRISHNAN *et al.*, 2009). Este retrovírus, que tem como material genético o RNA, apresenta afinidade pelo antígeno de superfície de linfócitos T CD4 e macrófagos, desencadeando alterações do sistema imunológico do hospedeiro (SILVA, LOPES & BARRETO, 2002).

Diante da destruição dos linfócitos T e, conseqüentemente, da debilidade do sistema imunológico do hospedeiro, há a instalação da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (CDC, 1994). Esta síndrome consiste num grupo de doenças graves e infecções oportunistas cujo diagnóstico é baseado em critérios clínicos e laboratoriais. Considerando os critérios laboratoriais, devemos destacar a contagem de Linfócitos T CD4 e a carga viral. À medida que o organismo passa a produzir anticorpos, essa carga tende a diminuir. O período de 4 a 6 semanas após a infecção é necessário para a produção dos anticorpos, podendo levar até 3 meses. Com o passar do tempo e diante da evolução da infecção, a contagem de linfócitos T CD4 cai, debilitando o sistema imunológico e permitindo assim a replicação viral, cuja carga volta a aumentar (CDC, 2008).

De acordo com o boletim da UNAIDS, havia cerca de 3,3 milhões de crianças infectadas pelo HIV em todo o mundo em 2012 (UNAIDS, 2013). No Brasil, a incidência da infecção pelo HIV na população jovem em idade fértil (15 a 24 anos) apresenta-se estabilizada, entretanto nas regiões Norte e Nordeste do país, a incidência da transmissão vertical aumentou durante os últimos onze anos, de modo que há uma crescente população de crianças infectadas pelo vírus (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

A transmissão vertical é a principal via de transmissão do HIV em crianças. Ela pode se dar durante a gestação (através da placenta), durante o parto (através do contato com fluidos corporais maternos durante o trabalho de parto e nascimento) ou pós- parto (através do aleitamento materno). A carga viral materna, fenótipo viral, tipo de parto e o estado imune materno são determinantes desta transmissão (NAIDOO & CHIKTE, 2004). Embora apresente padrão semelhante em adultos e crianças, a infecção pelo HIV apresenta peculiaridades inerentes aos pacientes infantis. Além do modo de transmissão, há diferenças nos fatores de risco, padrão de soro-conversão, história natural, espectro de doenças e lesões orais quando comparado ao quadro em adultos. Tais diferenças se devem, também, ao sistema imunológico infantil ainda em processo de maturação (DIAS, *et al.*, 2006; PINHEIRO *et al.*, 2009).

Logo após a infecção pelo HIV, ocorre uma fase assintomática. Em adultos, esta fase pode durar de poucos meses a cerca de 15 anos. Já em crianças, a fase assintomática é bem menor. Alguns apresentam sintomas nos primeiros meses de vida ou após alguns anos de vida, mas a grande maioria das crianças infectadas passa a apresentar sintomas da infecção antes dos 2 anos de idade (CDC, 2008). Condições clínicas como infecções bacterianas, encefalopatias e adenopatias frequentemente são as primeiras a acometer pacientes nesta condição, além de alterações orais como a candidíase (PINHEIRO *et al.*, 2009).

A cavidade bucal desempenha um papel importante na história natural da infecção pelo HIV e AIDS (NAIDOO & CHIKTE, 2004). Verrugas orais, alterações nas glândulas salivares (DIAS *et al.*, 2006), linfadenopatias, herpes simples e eritema gengival linear são condições comumente associadas à síndrome (PINHEIRO *et al.*, 2009). Além disso, lesões bucais como a leucoplasia pilosa e a candidíase bucal servem como marcadores para o monitoramento dos sinais iniciais de desenvolvimento da infecção (SHIBOSKI *et al.*, 2011; EVANS, MASKEW & SANNE, 2012).

A candidíase bucal é causada por leveduras do gênero *Candida*. *Candida albicans* é a espécie mais prevalente da cavidade oral (CERQUEIRA *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2012), entretanto outras espécies de *Candida* também têm se destacado como importantes patógenos comumente isolados em casos de infecções

disseminadas e invasivas (HAYNES, 2001; MICELI *et al.*, 2011). O grupo *C. parapsilosis lato sensu* tem se destacado como um patógeno associado a infecções nosocomiais (TROFA, GÁCSEK & NOSANCHUK, 2008). Até 2005, *C. parapsilosis* era subdividida em grupos I, II e III. Entretanto, houve a separação dos grupos II e III nas espécies *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, respectivamente (TAVANTI *et al.*, 2005). Desde então, o grupo I tem sido designado tão somente de *C. parapsilosis* ou *C. parapsilosis stricto sensu*. A diferenciação exata entre essas espécies não pode ser realizada por métodos fenotípicos, sendo necessária a realização de PCR e outras metodologias moleculares (GARCIA-EFFRON *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2012).

Candida spp. são fungos oportunistas e apresentam a habilidade de se estabelecerem em diferentes sítios do corpo humano sob diferentes condições ambientais (CALDERONE & FONZI, 2001). Estes fungos estão normalmente presentes como comensais desde o nascimento, podendo persistir por toda a vida nos tratos gastrointestinal, genital (MICELI *et al.*, 2011) e na cavidade bucal de indivíduos saudáveis (LI *et al.*, 2012; CASSONE, 2013). A habilidade de colonizar regiões anatômicas com características tão distintas e sob diferentes pressões ambientais lhes confere a capacidade de causar uma variedade de doenças (CALDERONE & FONZI, 2001; MENEZES *et al.*, 2006). Na superfície de mucosas, a limitação de nutrientes e a competição entre bactérias e fungos resultam na eliminação daqueles menos adaptados. Fatores locais como o uso de próteses e fatores sistêmicos como alterações imunológicas, favorecem o estabelecimento de *Candida* spp. e a invasão aos tecidos do hospedeiro (CALDERONE & FONZI, 2001).

Pertencente ao filo Ascomycota, estes fungos são obrigatoriamente diplóides. Inicialmente acreditava-se que eles não possuíam estágio sexual, entretanto foi observado o ciclo parassexual, no qual eles são capazes de se reproduzir por meio de uma fusão inicial com uma célula idêntica seguida por uma subsequente perda cromossômica aleatória, retornando ao seu estado diplóide (HEITMAN, 2011) e favorecendo o seu estabelecimento. Quando sob a forma de levedura, *Candida* spp. são unicelulares e se reproduzem por brotamento. Entretanto estes microorganismos podem apresentar crescimento filamentosos, promovendo a formação de hifas ou pseudo-hifas (MICELI *et al.*, 2011).

O aumento da população de *Candida* spp. pode ser comumente observado diante de alterações sistêmicas como a diabetes mellitus, AIDS, uso prolongado de antibióticos ou corticosteróides e radioterapia (ABACI, 2011). Ao se tornar um patógeno, estes fungos passam a expressar fatores de virulência para sobrepor os mecanismos de defesa do hospedeiro, favorecendo a sua adesão aos tecidos, proliferação e colonização. Neste processo, *Candida* spp. metabolizam proteínas do hospedeiro e produzem enzimas extracelulares que ocasionam a disfunção ou ruptura da membrana celular do hospedeiro (CALDERONE & FONZI, 2001).

A adesão de *Candida* spp. às células do epitélio bucal constitui uma fase inicial e imprescindível para a colonização, formação de biofilme (MANE *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2012) e dano aos tecidos do hospedeiro (COSTA *et al.*, 2012) ocasionando o desenvolvimento de lesões orais como queilite angular, candidíase pseudomembranosa, eritematosa e hiperplásica (SILVA-BOGHOSSIAN *et al.*, 2008).

Espécies de *Candida* aderem a células epiteliais, células endoteliais, fatores solúveis, matriz extracelular e materiais implantados no corpo do hospedeiro. Interações entre este fungo e o hospedeiro são mediadas por variadas adesinas, enquanto interações físicas o unem a materiais inertes (CHAFFIN *et al.*, 1998).

Após a adesão, ocorre a formação de biofilme de *Candida* spp. Este biofilme consiste em microcolônias de levedura, hifa e pseudo-hifa inseridas na matriz extracelular (MANE *et al.*, 2013; CUÉLLAR-CRUZ *et al.*, 2012). Esta matriz é composta por proteínas, carboidratos, fósforo e hexosaminas (SARDI, 2013). Isto favorece a multiplicação dos fungos, sua maturação, conferindo proteção contra as agressões do ambiente, principalmente de agentes antifúngicos (NETT & ANDES, 2006; CUÉLLAR-CRUZ *et al.*, 2012). A formação de biofilme de *Candida* spp. dá-se em três estágios que se desenvolvem durante 24-48 horas (CUÉLLAR-CRUZ *et al.*, 2012).

Após a adesão e colonização da superfície tecidual, há o crescimento e proliferação das leveduras, formando uma camada basal para o ancoramento das células. O crescimento de hifas e pseudo-hifas se dá na medida em que a matriz extracelular é formada. Assim, ocorre a disposição desses micro-organismos em microcolônias (CUÉLLAR-CRUZ *et al.*, 2012; MANE *et al.*, 2013).

Outro fator importante relacionado à invasão dos tecidos do hospedeiro é a transição dimórfica (MANE *et al.*, 2011). *C. albicans* inicialmente sob a forma de levedura passa a apresentar um crescimento filamentosos, promovendo a formação de hifas ou pseudo-hifas. Ambas as formas do fungo estão presentes na maioria das lesões de candidíase, sugerindo que elas desempenhem funções importantes no desenvolvimento e progressão da doença (CALDERONE & FONZI, 2001). Costa *et al.* (2012) observaram lesões de candidíase induzida no dorso lingual de ratos por *C. albicans* através de microscopia eletrônica de varredura e verificaram uma intensa penetração deste micro-organismo sob a forma de hifa. A infecção por *C. albicans* resultou na degradação de tecidos, atrofia e destruição de papilas filiformes e aumento da superfície interpapilar.

Quando em comensalismo com os tecidos do hospedeiro, *Candida* se apresenta sob a forma de levedura, induzindo resposta imune inata e adaptativa, gerando uma memória imunológica. Já durante o processo de infecção, esta resposta imune pode ser ineficiente contra a *Candida* e a memória imunológica não reconhece o fungo sob a forma de hifa, configurando uma evasão à resposta imune do hospedeiro (CASSONE, 2013). O fungo pode se desprender do biofilme, migrar e danificar outros tecidos, órgãos e atingir a corrente sanguínea, levando a infecção a níveis sistêmicos (NETT & ANDES, 2006; HASANA *et al.*, 2009; HEITMAN, 2011; CUÉLLAR-CRUZ *et al.*, 2012). Assim, o biofilme pode se tornar um reservatório para futuras infecções (MANE *et al.*, 2013). A produção de enzimas hidrolíticas extracelulares facilita a invasão tecidual em infecções causadas por *Candida* spp. Sendo assim, a secreção de enzimas como fosfolipases e proteases configuram importantes fatores de virulência desses micro-organismos (HAYNES, 2001; CALDERONE & FONZI, 2001; MANE *et al.*, 2012; CASSONE, 2013). As fosfolipases são enzimas que apresentam a habilidade de clivar ligações éster específicas dos fosfolipídios, formando um grupo heterogêneo de enzimas classificadas nos tipos A, B, C e D, de acordo com o tipo de reação a ser catalisada (GHANNOUM, 2000). De um modo geral, algumas fosfolipases hidrolisam cadeias acila (A₁, A₂, B e Lisofosfolipase), enquanto o outro grupo (C e D) relaciona-se à regulação da transdução de sinalização celular. As fosfolipases podem estar presentes no citoplasma, associadas à membrana celular e serem secretadas para o meio externo (GHANNOUM, 2000; RICHMOND & SMITH, 2011).

Essas enzimas podem desempenhar funções de enzimas digestivas, atuar na regulação de mecanismos celulares como a formação de moléculas usadas na sinalização transducional e intervir na manutenção e remodelação da membrana celular. A manutenção da composição acila dos fosfolipídios da membrana é uma função importante relacionada à integridade celular. (GHANNOUM, 2000; RICHMOND & SMITH, 2011).

Candida spp. possuem a habilidade de produzir fosfolipases e liberá-las para o meio. A quebra das ligações éster libera ácidos graxos, alterando o pH do meio. A formação de lisofosfolipídios promove a alteração de características da superfície celular, provocando danos à sua membrana (ABACI, 2011). A descontinuidade da membrana de células epiteliais pode acarretar a lise celular (MANE *et al.*, 2012). Este processo permite a penetração do tubo germinativo das hifas de *C. albicans*, promovendo a formação de lesões de candidíase (KANTARCIOGLU & YUCEL, 2002).

NAGLIK *et al.* (2003) correlacionaram a expressão de fosfolipase à infecção bucal ao analisar os genes relacionados à sua produção em isolados de *C. albicans* da cavidade oral e da vagina. A detecção de fosfolipase era mais intensa nos isolados provenientes de áreas de infecção oral por *C. albicans* do que em sítios saudáveis.

A produção de fosfolipase é um fator de virulência que não está presente somente em *C. albicans*. Ao estudar a atividade de fosfolipase de isolados de diferentes espécies de *Candida* da cavidade bucal, trato respiratório, sangue e sistema urogenital de pacientes com suspeita de micose invasiva, KANTARCIOGLU & YUCEL (2002) observaram que 93,3% dos isolados de *C. albicans* apresentavam a capacidade de produzir fosfolipase, enquanto poucas cepas de *C. glabrata* e *C. kefyr* também apresentavam esta habilidade. MOHAN & BALLAL (2008), ao analisar isolados de *Candida* spp. provenientes da corrente sanguínea detectou atividade de fosfolipase nos isolados de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. (KANTARCIOGLU & YUCEL, 2002; MOHAN & BALLAL, 2008).

A expressão de fosfolipases também parece estar relacionada à região anatômica de onde o isolado foi retirado. NAGLIK *et al.* (2003) observaram maior

expressão de fosfolipase por *C. albicans* dos isolados orais do que dos isolados vaginais. IBRAHIM *et al.* (1995) isolaram *C. albicans* da cavidade oral e do sangue; uma maior expressão extracelular de fosfolipase foi identificada nos isolados da corrente sanguínea.

Outras enzimas produzidas e secretadas por *Candida* spp. são as proteases. Essas enzimas hidrolisam ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas. De acordo com o seu mecanismo catalítico, elas são classificadas em serina proteases, cisteína, metaloproteases e aspártico-proteases. As aspártico-proteases apresentam massa molecular com cerca de 30-45 kDa e dependem de resíduos de ácido aspártico para atuar na parte interna das cadeias polipeptídicas, entre as regiões N e C terminal (RAO *et al.*, 1998; NAGLIK, CHALLACOMBE & HUBE, 2003).

Os micro-organismos têm a capacidade de produzir e secretar aspártico-proteases para adquirir nutrientes. Entretanto, esta habilidade bioquímica confere funções especializadas aos patógenos durante o processo infeccioso, promovendo a degradação de proteínas do hospedeiro (NAGLIK, CHALLACOMBE & HUBE, 2003).

Mane *et al.* (2011) em seu estudo acerca da expressão de fatores de virulência de isolados orais de *Candida* spp. observaram correlação positiva entre a atividade *in vitro* de aspártico-proteases e a aderência a células do epitélio bucal. A produção de protease ocorreu em 89,7% dos isolados de *C. albicans*, enquanto somente em 34,6% dos isolados de espécies de *Candida* não-*albicans*, como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Assim, espécies de *Candida* não-*albicans* também possuem a habilidade de produzir proteases, o que contribui com a sua virulência (MANE *et al.*, 2011).

A produção de aspártico-proteases desempenha um papel importante na patogênese de *Candida* spp. A digestão ou distorção da membrana das células do hospedeiro facilitam a adesão e a invasão tecidual; a degradação de proteínas de defesa do hospedeiro, como as imunoglobulinas, proteínas do complemento e citocinas, constitui uma importante ferramenta na evasão ao seu sistema imune. (IBRAHIM *et al.*, 1998; KANTARCIOGLU & YUCEL, 2002; NAGLIK, CHALLACOMBE & HUBE, 2003; CASSONE, 2013).

O Fluconazol é a droga de escolha para o tratamento de todos os tipos de infecção por *Candida* spp.. Este antifúngico pertence à classe dos triazóis e vem sendo utilizado para este fim desde 1994 (SCHULZ *et al.*, 2011). Este fármaco inibe a biossíntese de ergosterol, um componente importante da membrana citoplasmática fúngica. A interação com a enzima lanosterol α -demetilase, faz com que a conversão de lanosterol em ergosterol seja inibida. Assim, ocorre uma diminuição do conteúdo de ergosterol na membrana celular fúngica (TOBUDIC *et al.*, 2012), alterando a sua permeabilidade seletiva e causando o seu rompimento. Por atuar no citocromo P450 presente nos fungos e ausente nas células humanas, esta droga apresenta baixa toxicidade (SHEEHAN *et al.*, 1999).

Mudanças na epidemiologia das doenças fúngica têm sido observadas. (SCHMIDT-WESTHAUSEN, 2000; HAYNES, 2001; BADIEE & ALBORZI, 2011). A ativação de bombas de efluxo, alterações na biossíntese de esterol, o aumento da produção da enzima lanosterol 14- α -demetilase, assim como a transição morfológica têm sido relacionados ao desenvolvimento da resistência de *Candida* spp. a antifúngicos (JEDDY *et al.*, 2011; SCHULZ *et al.*, 2011).

O uso extensivo do fluconazol ocasiona a seleção de espécies resistentes (HAMZA *et al.*, 2008). Diante do insucesso do tratamento, infecções persistentes e refratárias se estabelecem. A resistência a antifúngicos se dá por evolução adaptativa dos fungos e geralmente resulta de mutações genéticas que podem ser transmitidas por até 30 gerações mesmo na ausência da droga (HUANG *et al.*, 2011). Geralmente, os isolados resistentes a um tipo de azol desenvolvem resistência cruzada a outro tipo de azol (WHITE *et al.*, 2002). *C. albicans* são a principal espécie de *Candida*, entretanto ocorre uma grande variação entre diferentes cepas e espécies de *Candida*, de modo que as espécies não- *albicans* também devem ser consideradas importantes patógenos no processo de infecções invasivas (ÁSMUNDSDÓTTIR *et al.*, 2009).

Considerando os pacientes infectados pelo HIV, com a introdução da terapia antirretroviral potente (HAART - Highly Active Antiretroviral Therapy), foram observadas mudanças significativas na prevalência de manifestações orais decorrentes da AIDS (SCHMIDT-WESTHAUSEN, 2000). Esta terapia consiste na combinação de três ou mais antirretrovirais de diferentes classes para combater a

multiplicação do vírus HIV no sangue. Infecções oportunistas eram a principal causa da morte de crianças infectadas pelo HIV, assim o uso do HAART tem reduzido a mortalidade e a morbidade relacionadas à infecção pelo HIV em nível global. (ÁLVARO-MECA *et al.*, 2013; KIERTIBURANAKUL *et al.*, 2014).

A candidíase é a infecção oportunista mais comum em crianças infectadas pelo HIV (DOMANESCHI *et al.*, 2011; ÁLVARO-MECA *et al.*, 2013). A introdução do HAART resultou na diminuição da incidência de candidíase nessa população (ÁLVARO-MECA *et al.*, 2013), embora a colonização por *Candida* spp. nestes indivíduos ainda seja maior do que em indivíduos sem evidências clínicas de imunossupressão (CERQUEIRA *et al.*, 2010). Embora menos frequente, após a introdução do HAART as lesões de candidíase tendem a ser mais resistentes (TAIWO & HASSAN, 2010), sendo extremamente relevante o estudo dos fatores de virulência de *Candida* spp. de crianças infectadas pelo HIV pós-HAART. Espera-se que os achados desse estudo venham promover o melhor entendimento dos mecanismos patogênicos de *Candida* spp. para que terapias mais eficazes sejam instituídas, colaborando com a qualidade de vida destes pacientes.

2. PROPOSIÇÃO

2.1. OBJETIVO GERAL

Comparar, *in vitro*, fatores de virulência e susceptibilidade ao Fluconazol de *Candida* spp. isoladas da saliva de crianças infectadas pelo HIV com a expressão desses fatores dos isolados provenientes de crianças sem clinicamente saudáveis.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a formação de biofilme de isolados de *Candida* spp. isolados da saliva de crianças infectadas pelo HIV, comparando com os isolados de crianças clinicamente saudáveis.
- Analisar a produção de fosfolipase de isolados de *Candida* spp. isolados da saliva de crianças infectadas pelo HIV, comparando com os isolados de crianças clinicamente saudáveis.
- Analisar a produção de protease de isolados de *Candida* spp. isolados da saliva de crianças infectadas pelo HIV, comparando com os isolados de crianças clinicamente saudáveis.
- Analisar a susceptibilidade ao Fluconazol de isolados de *Candida* spp. isolados da saliva de crianças infectadas pelo HIV, comparando com os isolados de crianças clinicamente saudáveis.
- Relacionar a expressão dos fatores de virulência e susceptibilidade ao Fluconazol dos isolados de *Candida* spp. de crianças infectadas pelo HIV com:
 - Uso de medicamentos antirretrovirais.
 - Grau de imunossupressão (percentual de linfócitos CD4).

- Presença de AIDS
- Carga Viral
- Presença de manifestações bucais

3. DELINEAMENTO DA PESQUISA

O presente estudo se caracterizou como uma pesquisa do tipo laboratorial transversal de caráter descritivo e analítico sobre a expressão de fatores de virulência de *Candida* spp. isoladas da saliva de crianças infectadas pelo HIV, comparando com crianças clinicamente saudáveis. Este estudo foi conduzido com os isolados clínicos previamente obtidos por Faria e cols. (Faria, 2013). A pesquisa na qual os isolados foram coletados obteve a aprovação do Comitê de Ética local do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira (CEP/IPPMG-RJ 63/11) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. A pesquisa atual obteve aprovação do adendo no projeto de pesquisa original (ANEXOS 1A, B e C, págs. 95, 96 e 97).

A saliva total estimulada foi coletada de crianças com diagnóstico definitivo para a infecção pelo HIV (pacientes do ambulatório de AIDS Pediátrica do IPPMG) e crianças clinicamente saudáveis (pacientes da clínica de Odontopediatria FO, UFRJ), seguida de exame oral; tais procedimentos foram realizados durante o primeiro semestre de 2012. Todas as crianças tinham termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado pelo responsável legal e anuência da criança (ANEXOS 2A e B, págs. 98 e 99). Crianças cujos valores de saliva estimulada foram iguais ou inferiores a 0,5 ml/min ou crianças que foram submetidas à terapia antifúngica há pelo menos três meses prévios à coleta, ou que estiverem em uso de corticosteróide, ou medicamentos antimicrobianos tópicos orofaríngeos não participaram do estudo.

Dados da história médica relativos à infecção pelo HIV como uso de HAART, classificação clínica e imunológica da doença, diagnóstico definitivo para infecção pelo HIV, presença de AIDS e os exames laboratoriais (contagem de CD4, relação CD4/CD8) mais recentes colhidos até três meses antes ou após do exame bucal, foram obtidos dos respectivos prontuários médicos. As informações sobre os pacientes clinicamente saudáveis foram obtidas através da pesquisa dos prontuários odontológicos da Clínica de Odontopediatria e anamnese. A coleta de saliva foi realizada no mesmo horário para todos os pacientes e esses não podiam ter ingerido alimentos, pelo menos 1 hora antes da coleta. Saliva estimulada foi

coletada em recipientes plásticos estéreis e descartáveis e, devidamente identificados e mantida sob refrigeração por no máximo 2 horas até ser transportada ao Laboratório de Biologia de Protistas (Departamento de Microbiologia Geral) do Instituto de Microbiologia Geral Professor Paulo Góes –UFRJ, onde era processada. Após a coleta, todos os pacientes foram examinados para verificar a presença de lesões bucais em tecidos moles, assim como a presença de cárie dentária.

As análises de isolamento e identificação dos isolados de *Candida* spp. (realizadas no Laboratório de Biologia de Protistas e no Laboratório de Estrutura de Superfície de Microrganismo do Instituto de Microbiologia Professor Paulo Góes, UFRJ) foram inicialmente feitas de forma presuntiva através da coloração das colônias reveladas no meio de cultura CHROMagar *Candida*® (ODDS & BERNAERTS, 1994) e posteriormente realizou-se a identificação definitiva das espécies de *Candida* spp. através de testes bioquímicos de fermentação e assimilação de açúcares, utilizando o sistema API 20C® (Biomérieux, Marcy L'Etoile, France).

A nossa amostra final foi constituída pelos isolados provenientes dos pacientes do grupo HIV (n=43) e pacientes clinicamente saudáveis (n=17), colonizados por *Candida* spp., totalizando 79 isolados, dentre os quais eram: *C. albicans* (48 isolados – 33 HIV/ 15 Controle), *C. parapsilosis* (20 isolados – 12 HIV/ 8 Controle), *C. krusei* (8 isolados - HIV), *C. dubliniensis* (1 isolado - HIV), *C. tropicalis* (1 isolado - HIV) e *C. guilliermondii* (1 isolado - HIV).

Para a determinação da expressão dos fatores de virulência de *Candida* spp., foram utilizados os protocolos descritos abaixo:

3.1. Formação de Biofilme

A formação de biofilme foi realizada de acordo com a metodologia proposta por THEIN, SAMARANAYAKE & SAMARANAYAKE (2007). Após o crescimento dos isolados clínicos de *Candida* spp. em BHI líquido (Brain Heart Infusion - BD Difco™, Maryland, Estados Unidos da América) por 48 horas a 37 °C sob agitação, três

lavagens celular com PBS (Phosphate Buffer Solution – KH_2PO_4 - NaCl - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; ph 7.2), resultando na suspensão celular de 10^7 células/ml em YNB (yeast nitrogen base - BD Difco™, Maryland, Estados Unidos da América) com 100mM de glicose, 100 μl da suspensão foi adicionado em placa de cultura de célula com 96 poços, que permaneceu por 1 ½ horas a 37 °C em suave agitação (75 rpm). Após este período, o sobrenadante foi removido, e seguido por duas lavagens suaves com PBS estéril para remoção das células não aderidas. Foram adicionados 200 μl de YNB estéril e as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas, sem agitação. Após este período, foi feita a remoção do sobrenadante e duas lavagens suaves com PBS estéril para retirada das células não aderidas ao biofilme formado. A quantificação do biofilme foi realizada pela adição de XTT (2,3-Bis-(2-Metoxi-4-Nitro-5-Sulfofenil)-2H-Tetrazólio-5-Carboxanilida, Invitrogen™, Life Technologies, Califórnia, Estados Unidos da América) com menadiona na proporção de 1:20 nos poços. A reação de redução do XTT pelos fungos se deu a 37°C por 3 horas na ausência de luz. Após esta incubação, o sobrenadante foi transferido para outra placa de 96 poços e a leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 492 nm.

3.1.1. *Microscopia Confocal*

Um isolado de *Candida* de cada espécie do grupo HIV, que exibiu maior formação de biofilme, foi selecionado para ser submetido à microscopia confocal para melhor ilustração da estrutura do biofilme maduro de *Candida* spp.. Após a formação do biofilme, o processamento para visualização no microscópio confocal (Leica TCS SP5) se deu como o descrito por Chandra *et al.* (2008). Os corantes utilizados foram concanavalin A-Alexa Fluor 88 conjugado conA (5 $\mu\text{l}/\text{ml}$) e FUN-1 (2 $\mu\text{l}/\text{ml}$) foi preparada (CHANDRA, MUKHERJEE & GHANNOUM, 2008). O FUN-1 é convertido em laranja-avermelhado por células metabolicamente ativas enquanto o Alexa Fluor-ConA se torna verde fluorescente devido aos resíduos de glicose e manose dos polissacarídeos da parede celular do fungo e da matriz extracelular (LATTIF *et al.*, 2010). Utilizou-se o microscópio confocal Leica TCS SP5 com

software LAS-AF 4.1.2. As imagens foram selecionadas através do programa FIJI IMAGEJ 1.48s (National Institute of Health, USA).

3.2. Atividade de Fosfolipase

A metodologia empregada foi a descrita por Price *et al.* (1982) e Ibrahim *et al.* (1995). Para cada 184 ml de água destilada foram acrescentados 13 g de ágar Sabouraud dextrose (Sabouraud Dextrose Agar, BD Difco™, Estados Unidos da América), 11,7 g de NaCl, 0,111 g de CaCl₂. A gema de ovo foi centrifugada a 500 xg por 10 minutos em temperatura ambiente e 20 ml do sobrenadante foi adicionado ao meio esterilizado. O meio foi dispensado em placas de Petri estéreis descartáveis de 90 mm com um volume aproximado de 20 ml por placa.

Os isolados de *Candida* spp. foram previamente crescidos em meio de cultura SDA por 24 horas e ajustados para aproximadamente 10⁷ células/ ml de solução salina estéril. Desta suspensão celular, 10 µl foram adicionados de forma pontual na superfície da placa. Em cada placa foram realizados 3 inóculos de diferentes isolados. As placas foram incubadas por até 4 dias a 37° C em atmosfera úmida.

A leitura foi realizada após 3 dias de incubação. A atividade de fosfolipase foi medida pela relação entre o diâmetro da colônia e a zona de precipitação (*Pz*). De acordo com este método um valor de *Pz* = 1,00 significa que a cepa é negativa para a produção de fosfolipase/lipase, enquanto que um valor de *Pz* = 0,63 significa que a cepa está produzindo grande quantidade de fosfolipase (Kantarcioglu & Yücel, 2002; Dagdeviren *et al.*, 2005).

3.3. Atividade de Protease

A metodologia empregada se baseou no método de Ruchel *et al.* (1982) e Oliveira *et al.* (1998), que utiliza o meio de cultura YCB (yeast carbon base - BD Difco™, Maryland, Estados Unidos da América), albumina sérica bovina fração V (Reagen, Curitiba, Brasil), e Protovit® (Bayer, São Paulo, Brasil). Este meio foi esterilizado em filtros de Milipore de 0,22 µm e adicionado ágar e água destilada

(previamente esterilizados). O meio foi vertido em placas de Petri estéreis descartáveis de 90 mm, perfazendo um volume aproximado de 20 ml por placa.

O inóculo de cada isolado de *Candida* foi preparado de forma semelhante ao usado para os experimentos de fosfatase. Em cada placa também foram realizados 3 inóculos de isolados diferentes. As placas foram incubadas por 8 dias a 37° C em atmosfera úmida.

A leitura foi realizada após 7 dias de incubação. A proteólise foi visualizada por coloração conforme descrito por Staib (1965). A atividade proteolítica foi medida pela relação entre o diâmetro da colônia e a zona de hidrólise. Esses valores foram interpretados de acordo com Kantarcioglu & Yücel (2002) e Dagdeviren *et al.* (2005).

3.4. Análise da Susceptibilidade ao Fluconazol: Concentração Mínima Inibitória (MIC)

A determinação do MIC de Fluconazol seguiu os métodos e critérios do CLSI/NCCLS, documento M-27, que descreve um teste de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica, podendo ser classificadas em sensível, suscetível e resistente ao medicamento testado.

O ensaio utilizou o método padrão de microdiluição com diferentes concentrações de Fluconazol e inóculo devidamente ajustados em meio RPMI-1640, em placas estéreis e descartáveis de 96 poços.

O meio de cultura utilizado no experimento foi o meio sintético RPMI-1640 com glutamina e sem bicarbonato, tamponado a pH 7,0 a 25° C com ácido hidroxietilpiperazina etanossulfônico. Os isolados de *Candida* spp. foram crescidos no meio Brain Heart Infusion (BHI - BD Difco™, United States of America) por 48 h a 37°C sob agitação. Suspensões de 5×10^3 céls/ ml foram ajustadas no meio RPMI-1640. Alíquotas de 100 µl da suspensão foram transferidas para cada poço da placa de 96 poços contendo 100 µl de Fluconazol em diferentes concentrações. A leitura das placas se deu em espectrofotômetro com comprimento de onda de 595 nm. O experimento foi realizado em triplicata.

O Fluconazol foi testado nas concentrações de 0,25 – 0,5 – 1,0 – 2,0 – 4,0 – 8,0 – 16,0 – 32,0 – 64,0 – 128,0 – 256,0 – 512,0 µg/ml.

3.5. Análise de Dados

Os dados foram tabulados e analisados pelo programa IBM SPSS Statistics versão 20. Testes paramétricos (para variáveis com distribuição normal) e não-paramétricos (para variáveis com distribuição não normal) foram utilizados para verificar as associações entre as variáveis. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Para comparações entre os grupos HIV e controle, em relação à formação de biofilme, utilizou-se o test T de Student para as variáveis numéricas e o Qui-quadrado para as variáveis categóricas. Além disso, o test T foi utilizado para verificar as associações entre formação de biofilme dentre as diferentes espécies de *Candida* e em relação aos dados médicos (ao uso de HAART, status de imunossupressão, presença de AIDS e carga viral) e manifestações orais, dentro do grupo HIV.

Para comparações entre os grupos HIV e controle, em relação a produção de fosfolipase, produção de protease e resistência ao Fluconazol, utilizou-se o teste de Mann-Whitney para as variáveis numéricas; e o Qui-quadrado para as variáveis categóricas. As associações entre estas variáveis e os dados médicos e manifestações orais no grupo HIV também foram analisadas.

Para fins de análises, as espécies *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii* e *C. tropicalis* foram agrupadas na categoria *Candida non-albicans*.

4. DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA

- 4.1. Artigo: Biofilm production of *Candida* species isolated from the oral cavity of HIV-infected children

Elaine Lima de **AMORIM**¹
Thais Pinto **ALVES**¹
Ariadne Nunes **ALONSO**²
José Alexandre da Rocha **CURVELO**²
Rosangela Maria de Araújo **SOARES**²
Maristela Barbosa **PORTELA**³
Gloria Fernanda Barbosa de Araújo **CASTRO**¹

¹ Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil.

² Department of General Microbiology, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil.

³ Department of Clinics and Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Universidade Federal Fluminense/Niterói, Brazil

Correspondence Author – Gloria Fernanda Barbosa de Araújo Castro

Caixa Postal: 68066 – Cidade Universitária - CCS

CEP: 21941-971 - Rio de Janeiro – RJ –Brazil

E-mail: gfbacastro@yahoo.com.br

Fax/phone: +5521 25622101

Abstract

The aim of this study was to assess the *in vitro* biofilm formation of *Candida* spp. isolated from HIV infected children and controls. Also, correlate the results with medical data and underwent confocal laser scanning microscopy. A total of 79 isolates were analyzed: 48 *C. albicans* isolates (33/15) and 20 *C. parapsilosis sensu lato complex* isolates (12/8) from HIV and control patients, respectively, while *C. krusei* (8), *C. tropicalis* (1), *C. dubliniensis* (1) and *C. guilliermondii* (1) from HIV patients only. Medical data was collected, considering antiretroviral therapy, CD4 count and viral load. The biofilm forming ability was analyzed through the XTT reduction assay technique. Representative isolates of each specie with the ability to form more quantity of mature biofilm (HIV group) underwent confocal laser scanning microscopy for the visualization of biofilm morphology and structure. All isolates were able to form biofilm (n=79). Quantitatively, *Candida* isolates from HIV-positive and negative children presented similar ability to form biofilm ($p>0.05$), although all *C. albicans* isolates from HIV group (33) were moderately or strongly biofilm producers. In *C. albicans* isolates from both, HIV and control groups, the biofilm formation was higher than in non-*albicans Candida* isolates ($p<0.05$). No correlations were found between medical data and *Candida* spp. biofilm formation. In conclusion, *Candida* spp. isolates recovered from HIV-positive and negative children present the same ability to form biofilm *in vitro*, highlighting the relevant role played by immunosuppression in the modulation of *Candida* virulence attributes.

Key words: *Candida*, HIV-infected children, biofilm formation

INTRODUCTION

Candida spp. are fungi usually present in the oral cavity (CHAGAS *et al.*, 2009; CERQUEIRA *et al.*, 2010), gastrointestinal and genital tracts of healthy individuals (MICELI *et al.*, 2011). *Candida albicans* is the most prevalent specie in the buccal cavity (CERQUEIRA *et al.*, 2010) while *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis* and *C. krusei* are important agents that may lead from superficial to

disseminated infections (HAYNES, 2001; MICELI *et al.*, 2011). Also, the complex *C. parapsilosis sensu lato* has been associated to nosocomial infections (TROFA, GÁCSEK & NOSANCHUK, 2008). In immunocompromised individuals, these microorganisms can lead to infections affecting the oral cavity (oral candidiasis), oropharynx, esophagus (MAYER, WILSON & HUBE, 2013) and disseminate to the bloodstream (HAYNES, 2001). The transition from commensal to opportunistic pathogen is supported by a variety of mechanisms to overcome host defense mechanisms, such as the adhesion to host cells, biofilm formation, phenotypic switching and the production of extracellular hydrolytic enzymes. These attributes are called virulence factors (CALDERONE & FONZI, 2001; HAYNES, 2001; MAYER FL, WILSON D & HUBE B, 2013).

When organized in biofilms, in general the cells are embedded in a self produced extracellular matrix containing proteins, carbohydrates, phosphorus and hexosamine (SARDI, 2013). The biofilm provides protection against drugs and microorganisms competition; the removal of harmful metabolic products; favors the acquirement and processing of nutrients (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2002); and enables the communication through the secretion of signaling molecules in a delimited population - Quorum sensing (MARTINEZ & FRIES, 2010). Despite the oral candidiasis prevalence decreased after the introduction of HAART therapy for HIV-infected children, the oral colonization by *Candida* spp. still remains high when compared to healthy patients (CERQUEIRA *et al.*, 2010). Additionally, when these fungal infections develop in oral mucosa, such lesions were more resistant to commonly antifungal therapy used (TAIWO & HASSAN, 2010). Therefore a better understanding of this infection pathogenesis is necessary in order to choose the best form of treatment and prevention. In this scenery, the objective of the present study was to compare the biofilm formation by *Candida* spp. isolates from oral cavity of HIV-positive and negative children.

MATERIALS AND METHODS

This study was approved by the Ethics Committee (CEP/IPPMG-RJ 63/11) and informed consent was obtained for each child from their legal guardians.

1. Clinical Isolates

The study was conducted on *Candida* spp. saliva isolates previously obtained by ALVES *et al.* (2014). The isolates were obtained from HIV infected children and their controls (clinically healthy children) and participants recruitment criteria, saliva collection and the distribution and identification of *Candida* species have been previously published elsewhere (ALVES *et al.*, 2014). In brief, children who were under antifungal therapy three months before the collect, who were using oropharyngeal antimicrobial drugs or children with a salivary flow less than 0.5 ml/min were excluded from the study. Medical information of HIV group regarding antiretroviral therapy (HAART), AIDS diagnosis and laboratorial tests results (CD4 and CD8 count and viral load) were collected from their medical records. Whole saliva samples collection was performed between 1:00 – 2:00 PM for all patients and children should not have eaten anything or brushed their teeth for a minimum of one hour. In order to verify the salivary flow, the child should chew a patterned parafilm tablet for 1 minute and dispense the saliva in a sterile detachable recipient. In case the salivary flow was more than 0.5 ml/min, the child would undergo the saliva collection procedure for 5 minutes. After that, an oral exam was performed. The salivary samples were stored under refrigeration and cultured (CHROMagar *Candida*[®] - PROBAC, São Paulo, Brazil) until 2 hours after its collection. The *Candida* spp. colonies were counted and then identified by sugar assimilation and fermentation method (API 20C system[®] - Biomerieux, Marcy L'Etoile, France).

Our sample consisted in a total of 79 *Candida* spp. isolates being 56 isolates from HIV group (33 *C. albicans*, 12 *C. parapsilosis*, 8 *C. krusei*, 1 *C. tropicalis*, 1 *C. dubliniensis* and 1 *C. guilliermondii* and 23 from control group (15 *C. albicans* and 8 *C. parapsilosis*). As long as molecular methods were not performed in the identification of *C. parapsilosis sensu lato* complex species (*C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. parapsilosis sensu strictu*), they were referred as *Candida*

parapsilosis (TAVANTI *et al.*, 2005; GARCIA-EFFRON *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2012).

2. Biofilm Formation Assay

The biofilm formation was performed according to the methodology described by THEIN, SAMARANAYAKE & SAMARANAYAKE (2007). Briefly, the microorganisms were grown on Brain Heart Infusion (BHI - BD Difco™, Maryland, United States of America) for 48h at 37°C under agitation and suspensions of each strain prepared using Yeast Nitrogen Base medium (YNB - BD Difco™, Maryland, United States of America) with 100 mM glucose. Each strain had 100 µl of cell suspension (10^7 cell/ml) added to each well in 96 wells plaque in triplicate. The system was kept under agitation (75 rpm) at 37°C for 1½ hours. After this time, the supernatant was removed, followed by two Phosphate Buffer Solution (PBS – pH 7.2) cell washing in order to remove the loosely adherent cells. An amount of 200 µl of fresh YNB were added to each well and incubated at 37°C for 48 hours without agitation. The biofilm quantification was determined by the addition of XTT (2, 3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-Carboxanilide . Invitrogen™, Life Technologies, California, United States) with menadione (1:20 proportion) in each well. The reduction of the tetrazolium salt continued for 3 hours at 37°C. After this process, 100 µl of the supernatant was collected, stored in a new plaque and read in spectrophotometer at 492 nm. The XTT reduction technique values were categorized in weakly, moderately and strongly producer, according to Sánchez-Vargas (2013).

3. Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

One representative isolate of each *Candida* specie from HIV group was selected to undergo CLSM for the better visualization of their biofilm morphology and architecture. The criteria selection was the ability to produce thick mature biofilm. Isolates were prepared according to the biofilm formation assay steps previously described and were incubated for 48 hours. The staining process was performed as described by Chandra *et al.* (2008). The dye mix was composed by the fluorescent

stains concanavalin A-Alexa Fluor 88 conjugate conA and FUN-1. FUN-1 is converted to orange-red by metabolical active cells while Alexa Fluor-ConA turns into fluorescent green, bidding to mannose and glucose residues of cell wall and extracellular matrix polysaccharides. Images were captured by the confocal microscope Leica TCS SP5 software LAS-AF 4.1.2 and processed by using Fiji ImageJ 1.48s (National Institute of Health, USA).

4. Statistical analysis

The data was tabulated in Excel 2013 and SPSS version 20.0 was used for statistical analysis. P-value <0.05 was considered significant. T-test, for numeric variables, and Chi-square test, for categorical variables, were used to compare the biofilm formation comparing HIV and Control groups. Also, T-test was performed to assess the biofilm formation among the different *Candida* species and according to the use of HAART, immunosuppression status, AIDS presence, viral load and oral manifestation within HIV group. *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii* and *C. tropicalis* were also aggregated into the non-*albicans Candida* group for further analysis.

RESULTS

Biofilm formation was detected in all assessed isolates (n= 79). Table 1 shows the biofilm formation among isolates of HIV (n=56) and control group (n=23). Significant differences between both groups were not observed (p=0.854; T Student test). Biofilm formation was higher in *C. albicans* isolates than in non-*albicans Candida* isolates from HIV and control groups, respectively (p<0.05). In relation to biofilm formation categorization, no statistical significant differences were observed between groups (p>0.05).

In *C. albicans* isolates from both, HIV and control groups, the biofilm formation was higher than in non-*albicans Candida* isolates (p<0.05). Among *C. albicans* and non-*albicans Candida* species, almost all isolates from HIV group were moderately or strongly biofilm producers, except for *C. parapsilosis* (also presented weak biofilm

producer isolates). In control group, 13.3% *C. albicans* isolates were weakly producers (2/15) while most *C. parapsilosis* isolates presented moderate biofilm formation (75%) but these difference were not significant ($p>0.05$).

The association between biofilm formation of *C. albicans*, non *albicans Candida* species *C. parapsilosis* and *C. krusei* and history/presence of oral candidiasis and medical data from HIV group was assessed. Use of HAART, immunosuppression, presence of AIDS and viral load did not seem to interfere in biofilm formation among the studied species ($p>0.05$). In relation to *C. parapsilosis* isolates ($n=12$) none of them were recovered from individuals with severe immunosuppression and although no statistical difference were found, biofilm forming ability tend to be increased in those isolates from children with detectable viral load ($p=0.06$). No statistical differences in biofilm formation were observed regarding history/presence of oral candidiasis. In HIV group, correlation between biofilm production and HAART use, immunological status, AIDS presence and viral load was not observed. More details of biofilm production regarding the different *Candida* species and medical data can be seen in Table 2.

The confocal laser scanning microscopy analysis of mature biofilm of each *Candida* specie can be seen in Figure 1. It was possible to notice the mature biofilm density difference among *Candida* species. Its thickness ranged from 12 to 45 μm . The presence of *Candida* spp. as yeasts, hyphae and pseudohyphae was also observed, such as the different organization of these cells.

DISCUSSION

Candida species are usually responsible for the development of life threatening infections in severely immunocompromised individuals (WILLIAMS *et al.*, 2013). Superficial infections as oropharyngeal candidiasis are more frequent and may prejudice the medication absorption and lead to malnutrition (SARDI, 2013). These infections are developing due to the *Candida* biofilm formation. *Candida* biofilms are formed by microcolonies of yeast, hyphae and pseudohyphae enclosed in the matrix. Its formation constitutes a pivotal step for the colonization and infection of tissues, such as the formation of oral lesions. After the initial adherence to

surfaces, the cells form colonies, produce extracellular polymeric substances and mature (BONHOMME & D'ENFERT, 2013). These cells can be released from the biofilm, migrate and damage other tissues, organs and even cause candidosis (HASANA *et al.*, 2009; CUÉLLAR-CRUZ *et al.*, 2012). The organization in biofilms helps to evade host immune mechanisms, to resist antifungal therapies and to establish the colonization of its microorganisms before the competition with other microorganisms (SARDI *et al.*, 2013). Therefore the investigation of *Candida* spp. biofilm formation among isolates from HIV children and its correlation with the disease history, clinical and laboratorial aspects of the infection is extremely relevant.

All *C. albicans* and non-*albicans Candida* isolates were able to produce biofilm in our study, showing similar ability in both groups. Regarding the semi-quantitative XTT reduction assay, our results showed that biofilm formation was higher in *C. albicans* isolates than in non-*albicans Candida* species in HIV and control groups but no differences were found between groups. Jin *et al.* (2003) assessed biofilm formation through the XTT assay and also noted no significant difference between HIV and control *Candida* oral isolates from adults. Mane *et al.* (2013) observed enhanced biofilm forming abilities of HIV *Candida* isolates. They also noticed its correlation with the CD4 counts, indicating immunosuppression. Our HIV sample was collected from mostly children with regular immune status. Only two children presented severe immunosuppression and were undergoing the antiretroviral therapy.

C. albicans is the most prevalent *Candida* specie among healthy and HIV individuals (DOMANESCHI *et al.* 2011; MANE *et al.*, 2011; MANE *et al.*, 2013) and this specie also presents the ability of forming biofilm in inert surfaces as medical implants, impacting the morbidity and mortality of patients who use these devices (BONHOMME & D'ENFERT, 2013). Thein *et al.* (2007) suggest that *C. albicans* also present the skill of growing and producing biofilm under anaerobic conditions, favoring its establishment in the buccal cavity. From our isolates, only two of them presented weak biofilm formation, while 46 from HIV and control groups were classified as moderate/strong biofilm producers. In *Candida* spp. biofilms, the extracellular matrix production contributes to preserve the biofilm integrity, acting like a physical barrier and enabling the presence of persistent cells (BONHOMME & D'ENFERT, 2013).

Regarding non-*albicans Candida* species, *C. parapsilosis sensu lato* complex has been rising as an important pathogen, being associated to nosocomial infections (TROFA, GÁCSEK & NOSANCHUK, 2008). It is the second most prevalent specie recovered from the blood of patients with candidemia (CANTÓN *et al.*, 2011) and may cause up to 90% of invasive infections, in association to other species (SARDI *et al.*, 2013). A trend in the increase of biofilm formation associated to the viral load increase was observed (Table 2). The high number of HIV copies in the blood jeopardizes the immunological system and may favor the colonization by *C. parapsilosis* such as its biofilm forming ability. This specie presents the ability to form biofilm on medical devices and to grow in parenteral nutrition, configuring a threatening to low-birth-weight infants leading this population to fungal and bloodstream infections. Particularly, infants and immunocompromised patients may be hospitalized in intensive care units due to clinical manifestations as endocarditis, meningitis, peritonitis, arthritis, eye infections, otomycosis, onychomycosis, vulvovaginitis, and urinary tract infections (TROFA, GÁCSEK & NOSANCHUK, 2008). In our study, most *C. parapsilosis* isolates presented moderate or strong ability to form biofilm. Although less complex than *C. albicans* biofilms, *C. parapsilosis* biofilm may also be resistant to traditional antifungals as azole and amphotericin B (TROFA, GÁCSEK & NOSANCHUK, 2008; TOBUDIC *et al.*, 2011).

Regarding the different *Candida* spp., Sánchez-Vargas (2013) *et al.* assessed the biofilm formation of oral mucosa *Candida* isolates obtained from edentulous/partially edentulous and diabetic adults. They observed higher biofilm production in *C. glabrata* than in *C. tropicalis*, *C. albicans* and *C. krusei* isolates, respectively. Comparing it to our study, only one *C. tropicalis* isolate was assessed, however, it presented similar biofilm formation to *C. albicans* isolates. Also, in agreement to them, we found that *C. albicans* isolates presented higher biofilm production than *C. krusei* isolates, regarding HIV group.

Mane *et al.* (2013) analyzed *Candida* biofilm of oral lesions isolates from HIV individuals and noted greater biofilm production in non-*albicans Candida* samples. In agreement with our results, *C. albicans* presented the ability to produce more biofilm in the work developed by Junqueira *et al.* (2011), assessing saliva and oropharyngeal candidiasis lesion isolates from HIV adults. Hawser & Douglas (1994) evaluated *Candida* spp. isolates from individuals with line infection and women with

vaginal candidiasis and observed more intense biofilm production among *C. albicans* isolates. In 2011, Junqueira *et al.* performed a study in which *Candida* isolates from HIV adults with candidiasis lesions were able to form biofilm similarly to isolates from invasive candidiasis recovered from HIV negative individuals. In that study, all the isolates were collected from candidiasis lesions while in our sample was collected from total saliva. Since severe immunosuppression was considered low in our sample significant differences were not observed regarding this data. Isolates of children from HIV group presenting regular immune status and moderate immunosuppression presented similar biofilm production as healthy children isolates.

All *C. albicans* isolates from HIV group were considered moderately and strongly biofilm producers, while 2 isolates from control group were classified as weak producers. The small number of control group *Candida* isolates could be considered a limitation factor in the statistical analysis when comparing HIV and control groups. Also, our study assessed few isolates of *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* and *C. guilliermondii* which were recovered from HIV children alone. Researches with more isolates of these species recovered from HIV and healthy children should be developed in order to clarify the influence of HIV infection in the biofilm forming ability of non-*albicans Candida* species.

In relation to HIV infection, no correlation was found between medical data of our sample and biofilm formation. HAART leads to the increase in the levels of CD4+ T lymphocytes, restoring the immune system of HIV infected children (POMARICO *et al.*, 2009). Since its introduction, the reduction of opportunistic infections, morbidity, hospitalizations and deaths in HIV-infected children has been observed (ÁLVARO-MECA *et al.*, 2013). A lower incidence of candidiasis may be observed even one month after HAART introduction (TAIWO & HASSAN, 2010), although it still remains higher in HIV children than in healthy children (ÁLVARO-MECA *et al.*, 2013). Quantitatively, the biofilm formation of isolates from HIV children undergoing HAART was similar to isolates from HIV children who do not undergo this therapy. However, the composition of the produced biofilm was not evaluated.

The method employed in our study has been used for the quantification of *Candida* biofilm under different conditions. The counting of colony forming units, dry-weight assessments and spectrophotometric assays are techniques also used in this

type of analysis despite their limitations (JUNQUEIRA *et al.*, 2011). The analysis of features as density, compaction, multilayer structure and growth aspects could provide relevant information of the produced biofilm (THEIN *et al.*, 2007). Also, the extracellular matrix composition influences the biofilm formation. Proteomic studies may reveal the presence of specific proteins related to biofilm cell surface (FINKEL & MITCHELL, 2011). Studies considering the association of different methods must be developed in order to improve the knowledge about *Candida* biofilm other than those from quantitative methods as XTT assay may provide. The understanding of the biofilm features would promote the development of new therapeutic targets against fungal infections.

Host conditions play a regulatory role in the virulence of *Candida* spp. Due to the ability to respond rapidly to environmental changes, these microorganisms take advantage of the compromised immune system, leading to infections (CALDERONE & FONZI, 2001; HAYNES, 2001). The biofilm formation was similar in HIV and control groups for from the 43 children involved in our study, only two of them presented AIDS. In the past, the HIV infection was associated to a low survival prognosis. However, with the introduction of HAART in 1996, this prognosis changed (TAIWO & HASSAN, 2010; ÁLVARO-MECA *et al.*, 2013). As we can observe in the studied population, the improvement in the control of the disease and consequently to the life quality of the HIV-infected people is a result of governmental efforts through programs and politics, associated to the World Health Organization guidelines.

Some authors suggest that HIV infection evolves *Candida* selection and the replacement for pathogenic strains in immunocompromised patients. This theory is supported by Jain *et al.* (2010), Mane *et al.* (2012) and Mane *et al.* (2013) who studied the expression of virulence factors over the HIV population. Our results showed that immunosuppression itself would play an important role in the modulation of biofilm forming attributes. HIV and control groups presented similar biofilm production for our study population was not considered immunosuppressed, according to CDC criteria. HIV and healthy children presented similar biofilm formation expression among *albicans* and non-*albicans* *Candida* species. Our results highlighted the important role played by immunosuppression in the regulation of *Candida* spp. virulence expression.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to thank all children attending the Pediatric AIDS Outpatient Clinic at the Universidade Federal do Rio de Janeiro (Brazil) and their families. Also, thanks to CAPES and FAPERJ (Brazil) for the financial support.

References

- ÁLVARO-MECA A, JENSEN J, MICHELOUD D, DÍAZ A, GURBINDO D, RESINO S (2013). *Rate of candidiasis among HIV-infected children in Spain in the era of highly active antiretroviral therapy (1997–2008)*. *Infectious Diseases* 13:115.
- ALVES TP, SIMÕES ACDC, SOARES RMA, MORENO DSA, PORTELA MB, CASTRO GFBA (2014). *Salivary lactoferrin in HIV-infected children: Correlation with Candida albicans carriage, oral manifestations, HIV infection and its antifungal activity*. *Archives of Oral Biology* (59): 775-782.
- BONHOMME J, D'ENFERT C (2013). *Candida albicans biofilms: building a heterogeneous drug-tolerant environment*. *Current Opinion in Microbiology* 16:398-403.
- CALDERONE RA, FONZI WA (2011). *Virulence factors of Candida albicans*. *Trends in Microbiology*. 9(7): p. 327-35.
- CANTÓN E, PEMÁN J, QUINDÓS G, ERASO E, MIRANDA-ZAPICO I, ÁLVAREZ M, MERINO P, CAMPOS-HERRERO I, MARCO F (2011). *Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification and antifungal susceptibility of Candida parapsilosis, Candida orthopsilosis and Candida metapsilosis isolated from patients with candidemia*. *Antimicrob Agents Chemoter* 55:5590-96.
- CDC – Centers for Disease Control and Prevention (1994). *Revised classification system for Human Immunodeficiency Virus Infection in children less than 13 years of age*. 43(RR-12): p.1-19.
- CERQUEIRA DF, PORTELA MB, POMARICO L, SOARES RMA, SOUZA IPR, CASTRO GF (2010). *Oral Candida colonization and its relation with predisposing factors in HIV-infected children and their uninfected siblings in Brazil: the era of highly active antiretroviral therapy*. *J Oral Pathol Med* 39:188-194.
- CHAGAS MS, PORTELA MB, CERQUEIRA DF, SOUZA IPR, SOARES RM, CASTRO GF (2009). *Reduction of Candida species colonization in the oral cavity of children infected with human immunodeficiency virus after dental treatment*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol endod* 108: 383-38

- CHANDRA, J., MUKHERJEE, P.K., GHANNOUM, MA (2008). *In vitro growth and analysis of Candida biofilm*. Nat. Protocol 3, 1909–1924.
- CUÉLLAR-CRUZ, M. et al., (2012). *The effect of biomaterials and antifungals on biofilm formation by Candida species: a review*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. Published on line: 12 May 2012.
- DOMANESCHI C, MASSARENTE DB, FREITAS RS, MARQUES HHS, PAULA CR, MIGLIARI DA, ANTUNES JL (2011). *Oral colonization by Candida species in AIDS pediatric patients*. Oral Dis, 17(4):393-8
- FINKEL JS, MITCHELL AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development (2011). Nature reviews Microbiology, Feb 9:109-118
- GARCIA-EFFRON G, CANTON E, PEMÁN J, DILGER A, ROMÁ E, PERLINDS (2011). *Assessment of two new molecular methods for identification of Candida parapsilosis sensu lato species*. Journal of Clinical Microbiology 49(9): 3257-61.
- GARCIA-EFFRON G, CANTON E, PEMÁN J, DILGER A, ROMÁ E, PERLINDS (2012). *Epidemiology and echinocandin susceptibility of Candida parapsilosis sensu lato species isolated from bloodstream infections at a Spanish university hospital*. Journal of Antimicrobiol Chemotherapy 67(11): 2739-48.
- HASANA F., XESSA I., WANGC X., JAINC N., FRIES B.C (2009). *Biofilm formation in clinical Candida isolates and its association with virulence*. Microbes Infect 11: 753–61.
- HAYNES, K (2001). *Virulence in Candida species*. TRENDS in Microbiology 9(12): p. 591-6.
- HAWSER SP, DOUGLAS LJ (1994). *Biofilm formation by Candida species on the surface of catheter materials in vitro*. Infect. Immun. 62(3):915.
- JAIN PA, VEERABHADRUDU K, KULKARNI RD, AJANTHA GS, SHUBHADA C, AMRUTHKISHAN U (2010). *Comparative study of adherence of oral Candida albicans isolates from HIV sero-positive individuals and HIV sero-negative individuals to human buccal epithelial cells*. Indian J Pathol Microbiol 53: 513–7.
- JIN Y., YIP H.K., SAMARANAYAKE H., YAU J.Y., SAMARANAYAKE L.P (2003). *Biofilm-Forming Ability of Candida albicans Is Unlikely To Contribute to High Levels of Oral Yeast Carriage in Cases of Human Immunodeficiency Virus Infection*. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 41(7): p. 2961–7.
- JUNQUEIRA J.C et al. (2011). *Oral Candida albicans isolates from HIV-positive individuals have similar in vitro biofilm-forming ability and pathogenicity as invasive Candida isolates*. BMC Microbiol 11: 247.

- MANE A, PAWALE C, GAIKWAD S, BEMBALKAR S, RISBUD A (2011). *Adherence to buccal epithelial cells, enzymatic and helolytic activities of Candida isolates from HIV-infected individuals*. Medical Mycology 49: 548-51.
- MANE A., GAIKWAD S., BEMBALKAR S., RISBUD A (2012). *Increased expression of virulence attributes in oral Candida albicans isolates from human immunodeficiency virus-positive individuals*. J Med Microbiol 61(pt 2): p. 285–90.
- MANE A., KULKARNI A., RISBUD A (2013). *Biofilm production in oral Candida isolates from HIV-positive individuals from Pune, India*, Mycoses 56: p. 182–6.
- MARTINEZ L.R., FRIES B.C (2010). *Fungal biofilms: relevance in the setting of human disease*. Curr Fungal Infect Rep 4(4): p. 266–75.
- MAYER F.L., WILSON D., HUBE B (2013). *Candida albicans pathogenicity mechanisms*. Virulence 4(2): p. 119–28.
- MICELI, MH, DÍAZ, JA, LEE AS (2011). *Emerging opportunistic yeast infections*. Lancet Infect Dis. Fevereiro. Vol. 11: 142–51.
- POMARICO L, CERQUEIRA DF, SOARES RMA, SOUZA IPR, CASTRO GFBA, SOCRANSKY S, HAFFAJEE A, TELES RP (2009). *Associations among the use of highly active antiretroviral therapy, oral candidiasis, oral Candida species and salivary immunoglobulin A in HIV-infected children*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. August ; 108(2): 203–210.
- SÁNCHEZ-VARGAS LO, ESTRADA-BARRAZA D, POZOS-GUILLEN AJ, RIVAS-CACERES R (2013). *Biofilm formation by oral clinical isolates of Candida species*. Archives of oral biology 58, 1320:1318–1326.
- SARDI JCO, SCORZONI L, BERNARDI T, FUSCO-ALMEIDA AM, GIANNINI MJS (2013). *Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options*. Journal of Medical Microbiology, 62, 10–24 DOI 10.1099
- SOCRANSKY SS, HAFFAJEE AD (2002). *Dental biofilms: difficult therapeutic targets*. Periodontology 2000, 28:12-55.
- SOUZA ACR, FERREIRA RC, GONÇALVES SS, QUINDÓS G, ELENA E, BIZERRA FC, BRIONES MRS, COLOMBO AL (2012). *Accurate identification of Candida parapsilosis (sensu lato) by use of mitochondrial DNA and Real-time PCR*. Journal of Clinical Microbiology 50(7): 2310-14.
- TAIWO AA, HASSAN Z. (2010). *The impact of Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) on the clinical features of HIV - related oral lesions in Nigeria*. AIDS Research and Therapy, 7:19.
- TAVANTI A, DAVIDSON AD, GOW NAR, MAIDEN MCJ, ODDS FC (2005). *Candida orthopsilosis and Candida metapsilosis spp. nov. to replace Candida parapsilosis groups II and III*. Journal of clinical microbiology, 43(1): 284-292.

- THEIN ZM, SAMARANAYAKE YH, SAMARANAYAKE LP (2007). *In vitro* biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. *Arch Oral Biol* 52(8):761-7.
- TOBUDIC, S. *et al.* (2012). Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. *Mycoses*. 55: 199-204.
- TROFA D, GÁCSEK A, NOSANCHUK JD (2008). *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* 21(4):606-625.
- WILLIAMS DW, JORDAN RPC, WEI X, ALVES CT, WISE MP, WILSON MJ, LEWIS MAO (2013). *Interactions of Candida albicans with host epithelial surfaces*. *Journal of Oral Microbiology* 5: 22434

Table 1: Biofilm production categorization among different *Candida* species from HIV and Control Groups

<i>Candida</i> specie	Biofilm formation (Mean OD 490 nm)				p-value
	n	HIV group	N	Control group	
<i>Candida albicans</i>	33	848,15±200.00 ^A	15	818,36±257.46 ^B	NS
non- <i>albicans</i> <i>Candida</i>	23	593,70±290.03 ^a	8	598,38±215.6 ^b	NS
<i>C. parapsilosis</i>	12	571.22±320.07	8	598,38±215.61	NS
<i>C. Krusei</i>	8	522.12±242.66	-	-----	
<i>C. dubliniensis</i>	1	1011.00	-	-----	
<i>C. guilliermondii</i>	1	813.00	-	-----	
<i>C. tropicalis</i>	1	799.33	-	-----	

<i>Candida</i> specie	Biofilm Formation Categorization		p-value
	HIV Group (n= 56)	Control Group (n=23)	
<i>C. albicans</i>			
Weakly	---	2 (13,33%)	NS
Moderately	12 (36,36%)	3 (20,00%)	
Strongly	21 (63,34%)	10 (66,67%)	
<i>C. parapsilosis</i>			
Weakly	6 (50,00%)	1 (12,50%)	NS
Moderately	3 (25,00%)	6 (75,00%)	
Strongly	3 (25,00%)	1 (12,50%)	
<i>C. krusei</i>			
Weakly	2 (25,00%)	---	
Moderately	5 (62,50%)	---	
Strongly	1 (12,50%)/ 1027,33	---	
<i>C. dubliniensis</i>			
Strongly	1 (100,00%)/ 1011,00	---	
<i>C. guilliermondii</i>			
Strongly	1 (100,00%)/ 813,00	---	
<i>C. tropicalis</i>			
Strongly	1 (100,00%)/ 799,33	---	

Note: Sánchez-Vargas, 2013. Biofilm formation by oral clinical isolates of *Candida* species. Considering OD 490 nm/ CFULog₁₀ cells/ml, strains were classified as: Not producer $\leq 0,10/ < 0,1 \times 10^8$; Weakly producer 0,11-0,40/ $0,1-0,75 \times 10^8$; Moderately producer 0,41-0,74/ $0,76-2 \times 10^8$; Strongly producer $\geq 0,75/ > 2 \times 10^8$. NS^a – No statistically significant (Mann-Whitney test)

Table 2: Association between *C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. krusei* biofilm formation and medical data from HIV group

HAART ¹	<i>C. albicans</i>			<i>Non albicans Candida</i>			<i>C. parapsilosis</i>			<i>C. krusei</i>		
	N	Mean	p-value	N	Mean	p-value	N	Mean	p-value	N	Mean	p-value
Yes	21	852.4 (±186.8)	0.89	19	570.1 (±294.8)	0.75	10	587.2 (±348.4)	0.75	7	449.9 (±141.7)	0.25
No	12	840.5 (±229.7)		4	705.6 (±274.4)		2	491.1 (±136.4)		1	1027.3	
Immunosuppression²												
Absent	19	857.7 (±229.8)	0.82	14	534.7(±226.0)	0.73	8	486.5 (±198.1)	0.49	5	556.4 (±269.8)	0.79
Moderate	12	844.5 (±161.2)		8	707.5 (±382.9)		4	740.6 (±476.0)		2	443.8 (±320.3)	
Severe	2	778.1 (±177.9)		1	507.3		--	--		1	507.3	
AIDS³												
Yes	2	778.1 (±177.9)	0.59	1	507.3	1.0	--	--		1	507.3	0.75
No	31	852.6 (±203.1)		22	597.6 (±296.2)		12	571.2 (±320.0)		7	524.2 (±262.0)	
Viral Load⁴												
Detectable	10	797.6 (±170.7)	0.14	5	801.1 (±372.4)	1.00	2	844.1 (±648.1)	0.46	1	507.3	.75
Undetectable	23	879.6 (±206.9)		18	536.0(±245.1)		10	516.6 (±242.2)		7	524.2(±262.0)	

Note: NS=not significant; SD=standard deviation; ^aMann-Whitney Test.

¹Use of three or more antiretroviral drugs (CDC, 1994).

²Immunological Classification (CD4%): Absent (>25%), Moderate (15-24%) and Severe (<15%).

³AIDS: CD4% < 15.

⁴Viral Load Classification: undetectable=<400 copies/ml

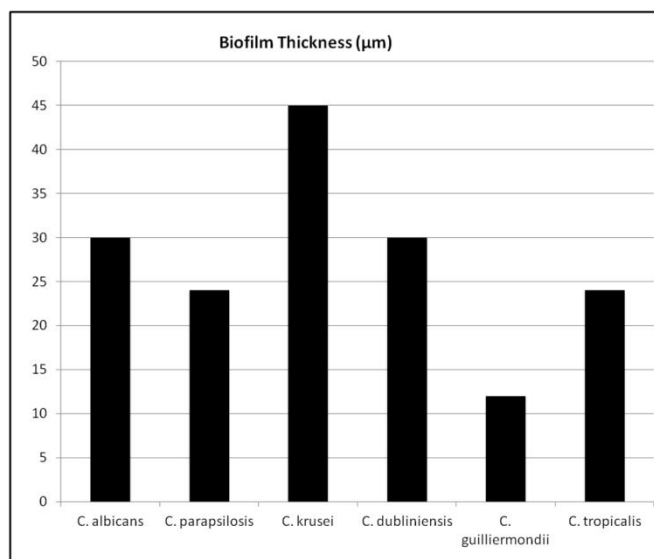
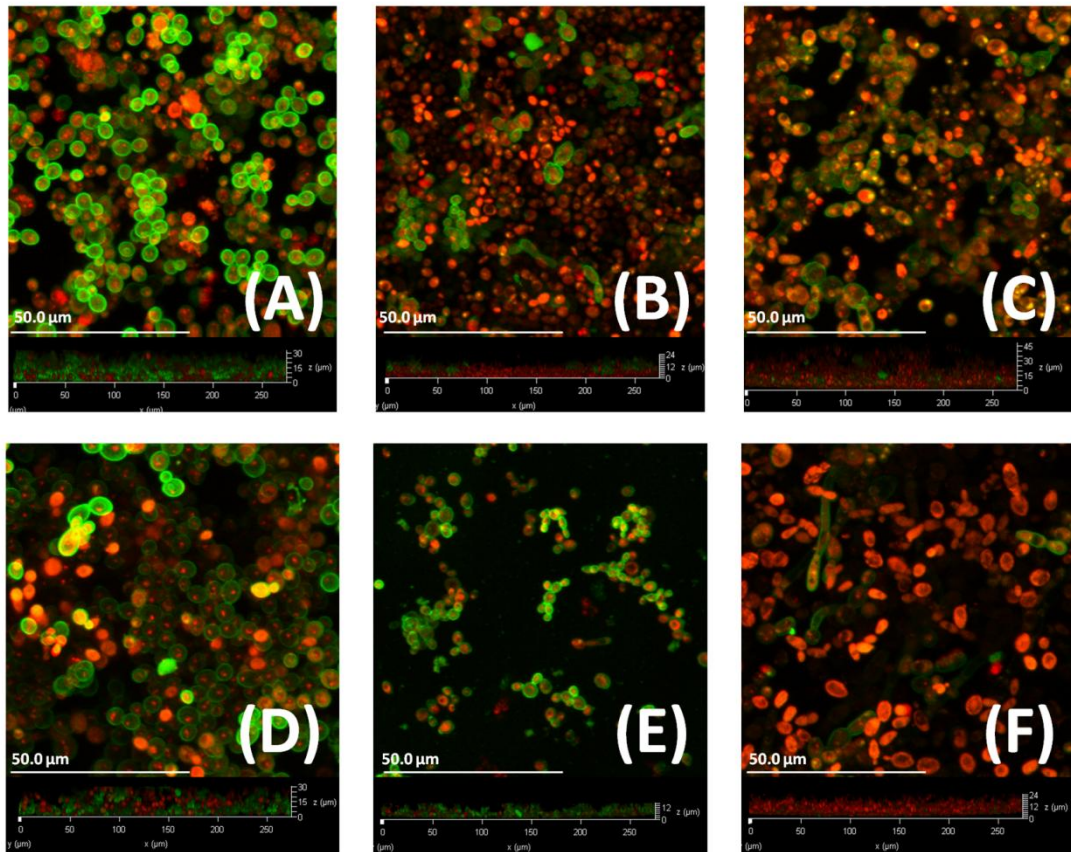


Figure 1: Confocal scanning laser microscopy of *Candida* spp. biofilms. A representative strain of (A) *C. albicans*, (B) *C. parapsilosis*, (C) *C. krusei*, (D) *C. dubliniensis*, (E) *C. guilliermondii* and (F) *C. tropicalis* were selected in order to illustrate the presence of yeasts, hyphae, pseudohyphae, different arrange and density of mature biofilm formed by *Candida* species. Biofilm thickness (μm) of each specie that underwent CLSM was determined by merging orthogonal view. Side-view images were obtained using software LAS-AF 4.1.2. Magnification: 40x.

4.2. Artigo: Virulence expression of *Candida* species isolated from the oral cavity of HIV-infected children

Elaine Lima de **AMORIM**¹
Thais Pinto **ALVES**¹
Ana Clara Duarte Correa **SIMÕES**¹
José Alexandre da Rocha **CURVELO**²
Rosangela Maria de Araújo **SOARES**²
Maristela Barbosa **PORTELA**³
Gloria Fernanda Barbosa de Araújo **CASTRO**¹

¹ Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil.

² Department of General Microbiology, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil.

³ Department of Clinics and Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Universidade Federal Fluminense/Niterói, Brazil

Correspondence Author – Gloria Fernanda Barbosa de Araújo Castro
Caixa Postal: 68066 – Cidade Universitária - CCS
CEP: 21941-971 - Rio de Janeiro – RJ –Brazil
E-mail: gfbacastro@yahoo.com.br
Fax/phone: +55 21 25622101

Abstract

Candida species are responsible for life threatening infections in severely immunocompromised individuals. Several virulence attributes support their transition from commensal to parasite, as the secretion of phospholipase, protease and the resistance to antifungals. The aims of this study were to assess the *in vitro* phospholipase and protease production and the susceptibility to Fluconazole of oral *Candida* spp. from HIV infected children and controls. A total of 79 isolates was assessed: 48 *C. albicans* isolates (33/15) and 20 *C. parapsilosis sensu lato complex* isolates (12/8) from HIV and control patients, respectively, while *C. krusei* (8), *C. tropicalis* (1), *C. dubliniensis* (1) and *C. guilliermondii* (1) from HIV patients only. Medical data was collected, regarding antiretroviral therapy, CD4 count and viral load. Phospholipase and protease assays were performed through the egg yolk and Bovine Serum Albumin agar plate methods, respectively. Fluconazole susceptibility was determined through the microdilution assay. Phospholipase activity was detected in 40.5% (32/79) of all isolates. Its activity was significantly higher in HIV group ($p=0.006$) and *C. albicans* isolates from HIV group ($p=0.007$). Protease activity was detected in 66 isolates (84.8%) and most of them from both groups were relatively/strongly producers. 33 (41.7%) of all isolates were resistant to Fluconazole. Most non-*albicans Candida* isolates from HIV (87.0%) and control (87.5%) groups were susceptible to this drug. No significant difference was detected between groups in protease and Fluconazole susceptibility assays. Correlation with medical data was not found. In conclusion, *Candida* spp. isolates of HIV-positive children present increased virulence expression due to significant higher *in vitro* phospholipase production. The regulation of *Candida* virulence may be related to immunosuppression.

Key words: *Candida*, HIV-infected children, phospholipases, virulence factors, fungal drug resistance.

INTRODUCTION

Candida species are usually responsible for the development of life threatening infections in severely immunocompromised individuals (WILLIAMS *et al.*, 2013). In HIV children, oral candidiasis has been associated to a decrease in CD4 lymphocyte count and the HIV viral load increase, being considered a predictor of AIDS development (EVANS, MASKEW & SANNE, 2012). Also, the damage in the oral tissues due to mucosal and oropharyngeal candidiasis may jeopardize the nutrition and medication absorption of these individuals (SARDI, 2013), enable the migration of these microorganisms to damage other tissues, organs and even cause candidosis (HASANA *et al.*, 2009; CUÉLLAR-CRUZ *et al.*, 2012).

Candida spp. is a commensal fungus in oral cavity but its conversion to parasitism and pathogenesis may occur associated with intraoral environmental changes or systemic conditions such as immunosuppression due to HIV infection. This change is supported by several virulence attributes as the expressions of adhesins, biofilm formation, morphological transition, secretion of hydrolytic enzymes and the resistance to antifungals (BADIEE & ALBORZI, 2011; MAYER, WILSON & HUBE, 2013). The production of hydrolytic enzymes and their release to the extracellular media seems to play an important role in adherence, host tissue penetration and destruction (PORTELA *et al.*, 2010; MANE *et al.*, 2011; MANE *et al.*, 2012).

The phospholipases are a group of enzymes that act in the regulation of mechanisms related to the cell maintenance, membrane remodulation and the triggering of inflammatory process in the arachidonic acid cascade (GHANNOUM *et al.*, 2000; RICHMOND *et al.*, 2011). Also, *Candida* spp. presents the ability to produce and secrete proteases in order to acquire nutrients. However, this skill is also important during the development of the infectious process, promoting the degradation of host proteins (RAO *et al.*, 1998; NAGLIK *et al.*, 2003). *Candida albicans* is not the only specie able to produce these enzymes as this activity was also detected in non-*albicans Candida* species (KANTARCIOGLU & YUCEL, 2002; MOHAN *et al.*, 2008; PORTELA *et al.*, 2010; MANE *et al.*, 2011).

Fluconazole is the choice drug for the treatment of *Candida* spp. infections (SCHULZ *et al.*, 2011). This drug inhibits the synthesis of ergosterol, an important component of the fungal cytoplasmic membrane, leading to its disruption (TOBUDIC

et al., 2012). The activation of efflux pumps and the overexpression of some genes have been related to tolerance and resistance to antifungals, which configures a challenge in the therapy against *Candida* infection in immunocompromised patients (SCHULZ *et al.*, 2011).

Since HAART introduction, the incidence of oral candidiasis in HIV-infected children decreased, although the frequency of *Candida* spp. oral colonization in these individuals is still higher than in healthy children (YANG *et al.*, 2006; CERQUEIRA *et al.*, 2010; ÁLVARO-MECA *et al.*, 2013). When present, the oral lesions tend to be more resistant to the antifungal therapy. In this context, the aim of this study was to analyze some virulence factors (phospholipase and protease, production and the susceptibility to Fluconazole) of *Candida* spp. isolated from the oral cavity of HIV-positive children.

MATERIALS AND METHODS

This study was approved by the Ethics Committee (CEP/IPPMG-RJ 63/11) and informed consent was obtained for each child from their legal guardians.

1. Clinical Isolates

A total of 79 *Candida* spp. isolates from 60 HIV infected and healthy children, previously obtained by ALVES *et al.* (2014) were assessed in this study. The HIV group was formed by 43 HIV-infected children attending the Pediatric AIDS Outpatient Clinic at the Universidade Federal do Rio de Janeiro (Brazil). The Control group formed by 17 children without immunosuppression signs was attended in the Pediatric Dentistry Department of the same institution. Participants recruitment criteria, saliva collection and the distribution and identification of *Candida* species have been previously published elsewhere (ALVES *et al.*, 2014). In brief, children who were under antifungal, therapy in the last three months or who were using oropharyngeal antimicrobial drugs or children with a salivary flow less than 0.5 ml/min were excluded from this study. Medical information of HIV group regarding antiretroviral therapy (HAART), AIDS diagnosis and laboratorial tests results (CD4 and CD8 count and viral load) were collected from their medical records and are show in Table 1. Whole saliva samples collection was performed between 1:00 –

2:00 PM and children should not have eaten anything or brushed your teeth for a minimum of one hour. After that, an oral exam was performed. The salivary samples were cultured (CHROMagar Candida[®] - PROBAC, São Paulo, Brazil) and the *Candida* spp. colonies counted and then identified by sugar assimilation and fermentation (API 20C system[®] - BioMérieux, Marcy l'Etoile, France). From the 79 *Candida* spp. isolates, 56 were from HIV group (33 *C. albicans*, 12 *C. parapsilosis*, 8 *C. krusei*, 1 *C. tropicalis*, 1 *C. dubliniensis* and 1 *C. guilliermondii*) and 23 from control group (15 *C. albicans* and 8 *C. parapsilosis*). As long as molecular methods were not performed in the identification of *C. parapsilosis sensu lato* complex species (*C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. parapsilosis sensu strictu*), they were referred in this study as *Candida parapsilosis* (TAVANTI *et al.*, 2005; GARCIA-EFFRON *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2012).

Medical information of HIV group regarding antiretroviral therapy (HAART), AIDS diagnosis and laboratorial tests results (CD4 and CD8 count and viral load) are shown in Table 1.

2. Phospholipase Assay

The phospholipase detection was performed according to the methodology described by Price *et al.* (1982) and Ibrahim *et al.* (1995) that used an egg yolk agar plate (1 M NaCl, 5 mM CaCl₂ and 8% sterile egg yolk emulsion, pH 7.0).

Candida isolates were previously grown on Brain Heart Infusion (BHI - BD Difco[™], Maryland, United States of America) for 48 h at 37°C under agitation. Suspensions of each strain containing 10⁷ cells/ml were adjusted and aliquots of 10 µl of each strain were spotted on the surface of petri dishes containing the culture media previously described. After the incubation (for 3 days at 37°C in humidified atmosphere), the phospholipase activity was measured by the rate between the colony diameter and the precipitation zone (*Pz*) (KANTARCIOGLU & YÜCEL, 2002; DAGDEVIREN *et al.*, 2005). According to this definition, the *Pz* value of the strains were classified as: *Pz*=1,00 means that the strain is negative for phospholipase production, while it is a weak producer when 0,99≤*Pz*≤0,90, mild when 0,89≤*Pz*≤0,80, relatively strong when 0,79≤*Pz*≤0,70 and very strong producer when *Pz*≤0,69.

3. Protease Assay

The method used to detect protease activity was based on Ruchel *et al.* (1982) and Oliveira *et al.* (1998) that using the albumin agar plate (1.17% yeast carbon base (YCB - BD Difco™, Maryland, United States of America) medium supplemented with 0.2% BSA (Reagen, Curitiba, Brazil) and 2.5% Protovit® (Bayer, São Paulo, Brazil), pH 4.0.

The suspension of *Candida* isolates were prepared and inoculated as described in phospholipase assay. The dishes were incubated for 7 days and the clear zone around the colonies (protease activity) was determined after staining with amido black.

4. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of Fluconazole assay

Fluconazole MIC was determined according to the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (M-27) (CLSI, 2002). The assay followed the serial microdilutions of the fluconazole. The minimum concentrations that inhibited yeast growth completely were defined as MIC.

Following NCCLS criteria, *Candida* isolates were classified according to their MIC value in sensitive (MIC \leq 8.0 $\mu\text{g/ml}$), susceptible (8.0 $\mu\text{g/ml}$ < MIC \leq 64.0 $\mu\text{g/ml}$) and resistant (MIC > 64.0 $\mu\text{g/ml}$) in order to determine the susceptibility to Fluconazole.

5. Statistical analysis

The data was tabled in Excel 2013 and the statistical package SPSS version 20.0 was used for analysis. P-value <0.05 was considered significant. Mann-Whitney test, for numeric variables, and Chi-square test, for categorical variables were used to compare the phospholipase production, protease production and susceptibility to Fluconazole comparing HIV and Control groups. Also, these tests were performed to assess the phospholipase production, protease production and susceptibility to Fluconazole of the different *Candida* species and according to the use of HAART, immunosuppression status, AIDS presence, viral load and presence/history of oral candidiasis within HIV group. For statistical analyses, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* and *C. dubliniensis* were aggregated into the non-*albicans* *Candida* group. For statistical analysis, in Phospholipase and Protease assays, the

categories weak, mild, relatively strong and very strong producer were grouped and recoded as producer. Regarding the susceptibility to Fluconazole, the categories sensitive and susceptible to Fluconazole were aggregated into non-resistant for further analysis.

RESULTS

Phospholipase production was found in 40.5% (32/79) of all assessed isolates (n=32). Table 2 shows its distribution among all *Candida* spp. isolates from HIV and Control groups. When the variable were re-grouped in producer or not producer, statistical significant difference ($p=0.006$) was found between HIV and Control groups, for while 50.0% (n=28) of HIV isolates were phospholipase producers, and only 17.3% (n=4) isolates of Control group were able to produce this enzyme. Evaluating each specie, the frequency of *C. albicans* presenting phospholipase production was significantly higher in HIV group ($p=0.007$). Means values and more information of non-*albicans Candida* species can be seen in Table 3.

Protease production was detected in a total of 66 isolates (84.8%). None of protease producers isolates were classified as weak in both groups, being all of them categorized from mild to very strong producers. Comparing HIV and Control groups, similar production was found ($p>0.05$) (table 2). According to different species, no statistical difference was observed regarding protease production of *C. albicans*, non-*albicans Candida*, *C. parapsilosis* and *C. krusei*, in both groups (table 3).

In relation to Fluconazole resistance, no difference was observed between HIV and control groups considering *Candida* spp. and intra species ($p>0.05$) (Table 2 and Table 3).

Within HIV group, correlations inter species show that isolates of *C. albicans* were more fluconazole resistant than *C. parapsilosis* and *C. krusei*. No correlation considering the virulence attributes expression and use of HAART, immunological classification, AIDS presence, viral load and history/ presence of oral lesions was observed

DISCUSSION

In our study, we assessed the expression of some virulence attributes in *Candida* spp. isolates from HIV-infected children and healthy controls. *Candida* spp. present the ability to produce and secrete hydrolytic enzymes (like phospholipase and protease) to the environment. This skill enhances the adhesion, colonization, leading to the cell membrane disruption and host tissue invasion (MENEZES *et al.*, 2006; CHAFFIN, 1998). In our study, 50% of isolates from HIV group and less than 20% from Control group were phospholipase producers, what is in agreement with Menezes *et al.* (2006) and Mane *et al.* (2011). Indeed, the phospholipase production of our *C. albicans* isolates was quantitatively higher in isolates recovered from HIV-infected individuals. Mane *et al.* (2012) also studied phospholipase production of *C. albicans* isolates from HIV adults and observed increased phospholipase production. Besides the degradation of cell membrane phospholipids, the phospholipase enzyme promotes the active invasion of host tissue, allowing the fungal hyphal tip to reach the cytoplasm (ABACI, 2001; KANTARCIOGLU & YUCEL, 2002).

The frequency of phospholipase production by *C. albicans* in our study was higher than in non-*albicans Candida* species. Junqueira *et al.* (2012) studied the oral colonization by yeast in HIV-infected individuals and also observed higher phospholipase activity in *C. albicans* than in non-*albicans Candida* isolates. In the same study, none of *C. parapsilosis* and *C. glabrata* isolates presented phospholipase production, similarly to our study, when all *C. parapsilosis* isolates recovered from HIV and Control groups didn't produce this enzyme (JUNQUEIRA *et al.*, 2012). Abaci (2011) studied the phospholipase production of *Candida* isolates from individuals with denture related stomatitis and also observed higher phospholipase production in *C. albicans* isolates than in other species.

Protease is an enzyme involved in the adherence and tissue damage in *Candida* infections (TSANG *et al.*, 2007). The degradation of host immunoglobulins and cytokines are important tools to evade host defense mechanisms (IBRAHIM *et al.*, 1998; KANTARCIOGLU & YUCEL, 2002; NAGLIK, CHALLACOMBE & HUBE, 2003; PORTELA *et al.*, 2010). The high frequency of protease production observed in our study compares favorably with Ollert *et al.* (1995), Menezes *et al.* (2006) and Mane *et al.* (2011). Mane *et al.* (2012) observed greater quantitative protease

production in isolates recovered from HIV adults than in their controls. In the same study, the isolates from HIV group were swabbed from the oral lesion (when present) and none of healthy individuals presented lesion at the collect time. In our study the quantitative expression of protease was similar in HIV and control groups. However the isolates of individuals with or without oral lesions of both groups were collected from the total saliva.

Considering the different species, the great majority of *C. albicans* isolates was able to produce protease, just like most of non-*albicans Candida* species assessed in our study. Chaves *et al.* (2013) analyzed *Candida* spp. from the oral cavity of immunosuppressed individuals (kidney transplant recipients) and did not detect significant difference in protease production between *C. albicans* and other *Candida* species. Kantarcioglu & Yucel (2002) studied the production of this enzyme in *Candida* spp. from oral cavity, respiratory tract, urogenital systems and blood recovered from patients suspected for invasive mycoses and observed protease production in the two *C. parapsilosis* isolates studied. In our study we also detected high activity of this enzyme in *C. parapsilosis* isolates, suggesting it may be an important virulence factor for this specie.

Phospholipase and protease activities were not correlated to candidiasis history/ presence and HIV infection features among the HIV group. Although these enzymes are potentially relevant for the establishment of *Candida* infections, their production was similar in isolates from individuals who presented or not oral candidiasis. Mane *et al.* (2012) did not observe correlation between the intensity of phospholipase and protease production and the presence of oral candidiasis in HIV infected individuals. Abaci (2011) did not find correlation between the frequency of production of these enzymes and the presence of stomatitis in denture wearers. However there are several virulence factors that may be expressed by *Candida* spp. during infection. Their expression may vary according to the type of infection and its stage (MANE *et al.*, 2011). More studies must be developed in order to elucidate the role played by phospholipase and protease in this process.

The performance of antifungal susceptibility tests is an important tool in the selection of an efficient therapy, especially in immunocompromised individuals, who present risk of developing life threatening systemic candidiasis (BADIEE &

ALBORZI, 2011). The decrease in drug intracellular accumulation through the activation of efflux pumps promoting the presence of sub-inhibitory drug levels has been associated to Fluconazole resistance. The overexpression of genes related to ergosterol and genetic mutations may be mechanisms used by *Candida* spp. to determine the resistance to Fluconazole (SCHULZ *et al.*, 2011; TOBUDIC *et al.*, 2011). In our study the resistance to Fluconazole was observed in about 40% of all isolates. Jeddy *et al.* (2011) studied the Fluconazole sensitivity of oral *Candida* isolates of HIV-infected adults and found that 21% of isolates recovered from individuals with oral candidiasis were resistant to this drug. This frequency is considered high when compared to Hamza (2008) and Nweze & Ogbonnaya (2011), who studied the susceptibility to Fluconazole of *Candida* oral isolates from HIV-infected adults.

Regarding the species, more than 85% of resistant strains were *C. albicans*. This data is really relevant, since it is the most common *Candida* specie isolated from the buccal cavity of HIV-infected children (CHAGAS *et al.*, 2009; CERQUEIRA *et al.*, 2010). Nweze & Ogbonnaya (2011) assessed the antifungal susceptibility of *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* and *C. dubliniensis* recovered from HIV adults. Following *C. dubliniensis*, *C. albicans* presented the second highest frequency of Fluconazole-resistant isolates in that study. In our study we assessed only one isolate of *C. dubliniensis* and it was susceptible to this drug as well as the only *C. tropicalis* isolate of our study was resistant to it. Howsoever, *C. albicans* isolates were more resistant to Fluconazole than *C. parapsilosis* and *C. guilliermondii*, in agreement with our study. In relation to *C. krusei*, 25% of our isolates were resistant to Fluconazole, like 50% of the isolates analyzed by Nweze & Ogbonnaya (2011), although in their study just 2 isolates underwent the susceptibility test. Although some non-*albicans Candida* species are intrinsically less sensitive to Fluconazole (JEDDY *et al.*, 2011; PREMKUMAR *et al.*, 2014), *C. albicans* remains the most important opportunistic pathogen (SPAMPINATO & LEONARDI, 2013). Thus, their resistance to Fluconazole, which is the choice drug for *Candida* infections, represents a threatening for the treatment of oral candidiasis.

The extensive use of Fluconazole in the treatment of mucosal candidiasis may lead to the selection of resistant strains (HAMZA *et al.*, 2008), by the

colonization with less susceptible strains (BADIEE *et al.*, 2010). However, in our study the resistance to this drug was not associated to its use. Regarding the HIV group, there was no correlation between HAART use and infection features with Fluconazole resistance. Also, in our study, the distribution of the resistant isolates was similar in HIV and control groups. Ben-Ami *et al.* assessed the association between the resistance of *Candida* spp. collected from the bloodstream to Fluconazole and through a multivariate analysis could relate it to the use of antibiotics (prior to the candidemia development). They suggest that the extensive use of these drugs may promote the selection of Fluconazole-resistant invasive strains. The use of antibiotics is common in HIV-infected children in order to prevent bacterial infections (CDC, 1991) and also in HIV-negative children (ALUMRAN, HOU & HURST, 2013). Several factors are involved with the development of Fluconazole resistance, nevertheless the extensive use of antibiotics may be one of them.

Except by the phospholipase production, the expression of virulence factors by *Candida* isolates recovered from HIV-infected and uninfected children seem to be similar. Immunosuppression itself may play an important role in the transition of *Candida* spp. from commensal to pathogen (HAYNES, 2001; CALDERONE & FONZI, 2001). Since the great majority of the isolates involved in this study were not collected from severely immunocompromised children, significant difference in the expression of *Candida* spp. virulence attributes between HIV-infected and healthy children was not observed. HIV-infected children are born with this infection and their immature immunological system develops in the presence of the infection (PINHEIRO, 2009). Since HAART promoted the improvement in the life quality and decreased the mortality of HIV-infected children, more studies must be developed in order to enlighten the establishment of *Candida* spp. virulence in HIV infected children.

REFERENCES

- ABACI, O (2011). *Investigation of extracellular phospholipase and proteinase activities of Candida species isolated from individuals denture wearers and genotypic distribution of Candida albicans strains*. Cur Microbiol 62: 1308-1314.
- ALUMRAN A, HOU XY, HURST C (2013). *Assessing the overuse of antibiotics in children in Saudi Arabia: validation of the parental perception on antibiotics scale (PAPA scale)*. Health and Quality of Life Outcomes, 11:39.
- ÁLVARO-MECA A, JENSEN J, MICHELOUD D, DÍAZ A, GURBINDO D, RESINO S (2013). *Rate of candidiasis among HIV-infected children in Spain in the era of highly active antiretroviral therapy (1997–2008)*. Infectious Diseases 13:115.
- ALVES TP, SIMÕES ACDC, SOARES RMA, MORENO DSA, PORTELA MB, CASTRO GFBA (2014). *Salivary lactoferrin in HIV-infected children: Correlation with Candida albicans carriage, oral manifestations, HIV infection and its antifungal activity*. Archives of Oral Biology (59): 775-782.
- BADIEE P, ALBORZI A (2011). *Susceptibility of clinical Candida species isolates to antifungal agents by E-test, Southern Iran: a five year study*. Iranian Journal of Microbiology. 4:183-188.
- BADIEE P, ALBORZI A, DAVARPANAH MA, SHAKIBA E (2010). *Distributions and antifungal susceptibility of Candida species from mucosal sites in HIV positive patients*. Arch Iran Med 13(4):282-87.
- CALDERONE RA, FONZI WA (2011). *Virulence factors of Candida albicans*. Trends in Microbiology. 9(7): p. 327-35.
- CDC (1991). *Guidelines for Prophylaxis Against Pneumocystis carinii Pneumonia for Children Infected with Human Immunodeficiency Virus*. Recommendations and Reports MMWR. March 15, 1991 / 40(RR02);1-13.
- CERQUEIRA DF, PORTELA MB, POMARICO L, SOARES RMA, SOUZA IPR, CASTRO GF (2010). *Oral Candida colonization and its relation with predisposing factors in HIV-infected children and their uninfected siblings in Brazil: the era of highly active antiretroviral therapy*. J Oral Pathol Med 39:188-194.
- CHAFFIN WL et al. (1998). *Cell wall and secreted proteins of Candida albicans: Identification, Function, and expression*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 62: 130-180.
- CHAGAS MS, PORTELA MB, CERQUEIRA DF, SOUZA IPR, SOARES RM, CASTRO GF (2009). *Reduction of Candida species colonization in the oral cavity of children infected with human immunodeficiency virus after dental treatment*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol endod 108: 383-38.
- CHAVES GM, DINIZ MG, SILVA-ROCHA WP, LBFN SOUZA, GONDIM LAM et al. (2013). *Species Distribution and Virulence Factors of Candida spp.*

Isolated from the Oral Cavity of Kidney Transplant Recipients in Brazil. Mycopathologia 175:255–263.

- CLSI (2002). *Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada—Segunda Edição.* NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos.
- CUÉLLAR-CRUZ M *et al.*, (2012). *The effect of biomaterials and antifungals on biofilm formation by Candida species: a review.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis. Published on line: 12 May.
- DAGDEVIREN M, CERIKCIOGLU N, KARAVUS M (2005). *Acid proteinase, phospholipase and adherence properties of Candida parapsilosis strains isolated from clinical specimens of hospitalized patients.* Mycoses, v. 48, p. 321–326.
- EVANS D, MASKEW M, SANNE I (2012). *Increased risk of mortality and loss to follow-up among HIV-positive patients with oropharyngeal candidiasis and malnutrition prior to ART initiation – A retrospective analysis from a large urban cohort in Johannesburg, South Africa.* Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. March ; 113(3): 362–372.
- GARCIA-EFFRON G, CANTON E, PEMÁN J, DILGER A, ROMÁ E, PERLIN DS (2011). *Assessment of two new molecular methods for identification of Candida parapsilosis sensu lato species.* Journal of Clinical Microbiology 49(9): 3257-61.
- GHANNOUM MA (2000). *Potential Role of Phospholipases in Virulence and Fungal Pathogenesis.* Clin. Microbiol. Rev., v. 13, n. 1, p. 122-143.
- HAMZA OJM *et al.* (2008). *Species distribution and in vitro antifungal susceptibility of oral yeasts isolates from Tanzanian HIV-infected patients with primary and recurrent oropharyngeal candidiasis.* BMC Microbiology 8:135.
- HASANA F, XESSA I, WANGC X, JAINC N, FRIES BC (2009). *Biofilm formation in clinical Candida isolates and its association with virulence.* Microbes Infect 11: 753–61.
- HAYNES K (2001). *Virulence in Candida species.* TRENDS in Microbiology 9(12): p. 591-6.
- IBRAHIM AS *et al.* (1998). *Secreted aspartyl proteinases and interactions of Candida albicans with human endothelial cells.* Infect. Immun. 66:3003–3005.
- JAIN PA, VEERABHADRUDU K, KULKARNI RD, AJANTHA GS, SHUBHADA C, AMRUTHKISHAN U (2010). *Comparative study of adherence of oral Candida albicans isolates from HIV sero-positive individuals and HIV sero-negative individuals to human buccal epithelial cells.* Indian J Pathol Microbiol 53: 513–7.

- JEDDY N *et al* (2011). *A study of antifungal drug sensitivity of Candida isolated from human immunodeficiency virus infected patients in Chennai, South India*. J Oral Maxillof Pathol. May-August 15 (2): 182-186.
- JUNQUEIRA JC, VILELA SFG, ROSSONI RD, BARBOSA JO *et al.* (2012). *Oral colonization by yeasts in HIV-positive patients in Brazil*. Rev. Inst. Med. Trop. 54(1):17-24, January-February.
- KANTARCIOGLU SA, YUCEL A (2002). *Phospholipase and protease activities in clinical Candida isolates with reference to the sources of strains*. Mycoses 45: 160-165.
- MANE A, GAIKWAD S, BEMBALKAR S, RISBUD A (2012). *Increased expression of virulence attributes in oral Candida albicans isolates from human immunodeficiency virus-positive individuals*. J Med Microbiol 61(pt 2): 285–90.
- MANE A, PAWALE C, GAIKWAD S, BEMBALKAR S, RISBUD A (2011). *Adherence to buccal epithelial cells, enzymatic and hemolytic activities of Candida isolates from HIV-infected individuals*. Medical Mycology 49: 548-51.
- MANE A, KULKARNI A, RISBUD A (2013). *Biofilm production in oral Candida isolates from HIV-positive individuals from Pune, India*, Mycoses 56: 182–6.
- MAYER FL, WILSON D, HUBE B (2013). *Candida albicans pathogenicity mechanisms*. Virulence 4(2):119–28.
- MENEZES EA *et al.* (2006). *Frequency and enzymatic activity of Candida albicans isolated from the oral cavity of HIV-positive patients at Fortaleza, Ceará*. J Bras Patol Med Lab 42(4):253-256.
- MOHAN V, BALLAL M (2008). *Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in Candida species isolated from blood*. Rev Iberoam Micol; 25: 208-210.
- NAGLIK JR *et al.* (2003). *Differential Expression of Candida albicans Secreted Aspartyl Proteinase and Phospholipase B Genes in Humans Correlates with Active Oral and Vaginal Infections*. The Journal of Infectious Diseases 188:469–79.
- NAGLIK JR, CHALLACOMBE SJ, HUBE B (2003). *Candida albicans Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67(3):400.
- NWEZE EI, OGBONNAYA UL (2011). *Oral Candida isolates among HIV-infected subjects in Nigeria*. Jour of Mic Imm Inf 44,172-177.
- OLIVEIRA EE, SILVA SC, SOARES AJ, ATTUZ C, CRUVINEL B, SILVA MR (1998). *Toxinas killer e produção de enzimas por Candida albicans isoladas da mucosa bucal de pacientes com câncer*. Rev. Soc. Bras. Med Trop 31(6):523-527.
- OLLERT MW, WENDE C, GORLICH M, MCMULLAN-VOGEL CG *et al.* (1995). *Increased expression of Candida albicans secretory proteinase, a putative virulence factor, in isolates from human immunodeficiency virus-positive patients*. J. Clin. Microbiol. 1995, 33(10):2543.

- PINHEIRO RS *et al.* (2009). *Oral manifestations in Human Immunodeficiency virus infected children in highly active antiretroviral therapy era.* J Oral Pathology 38:613-622.
- PORTELA MB, SOUZA IP, ABREU CM, BERTOLINI M, HOLANDINO C, ALVIANO CS, SANTOS AL, SOARES RM (2010). Effect of serine-type protease of *Candida* spp. isolated from linear gingival erythema of HIV-positive children: critical factors in the colonization. J Oral Pathol Med. Nov 39(10):753-60.
- PREMKUMAR J, RAMANI P, CHANDRASEKAR T, NATESAN A, PREMKUMAR P (2014). *Detection of species diversity in oral candida colonization and anti-fungal susceptibility among non-oral habit adult diabetic patients.* Nat Sci Biol Med. Jan-Jun; 5(1): 148-154.
- PRICE MF, WILKINSON ID, GENTRY LO (1982). *Plate Method for Detection of Phospholipase Activity in Candida albicans.* Sabouraudia, 20:7-14.
- RAO MB, TANKSALE AM, GHATGE MS, DESHPANDE VV (1998). *Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases.* Mic Mol Biol Rev, Sept. p. 597–635.
- RICHMOND GS, SMITH TK (2011). *Phospholipase A₁.* Int. J. Mol. Sci., 12, 588-612.
- RUCHEL R, TEGELER R, TROST M (1982). *A Comparison of Secretory Proteinases from Different Strains of Candida albicans.* Sabouraudia, 20: 233-244.
- SARDI JCO, SCORZONI L, BERNARDI T, FUSCO-ALMEIDA AM, GIANNINI MJS (2013). *Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options.* Journal of Medical Microbiology, 62, 10–24.
- SCHULZ B *et al.* (2011). *Difference in virulence between fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant Candida albicans in a mouse model.* Mycoses 54:e522-e530
- SOUZA ACR, FERREIRA RC, GONÇALVES SS, QUINDÓS G, ELENA E, BIZERRA FC, BRIONES MRS, COLOMBO AL (2012). *Accurate identification of Candida parapsilosis (sensu lato) by use of mitochondrial DNA and Real-time PCR.* Journal of Clinical Microbiology 50(7): 2310-14.
- SPAMPINATO C, LEONARDI D (2013). *Candida Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents.* BioMed Research International. Article ID 204237, 13 pages.
- TAVANTI A, DAVIDSON AD, GOW NAR, MAIDEN MCJ, ODDS FC (2005). *Candida orthopsilosis and Candida metapsilosis spp. nov. to replace Candida parapsilosis groups II and III.* Journal of clinical microbiology, 43(1): 284-292.
- TOBUDIC S *et al.* (2012). *Antifungal susceptibility of Candida albicans in biofilms.* Mycoses. 55: 199-204.

- TSANG CSP *et al.* (2007). *Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of Candida albicans isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus.* Journal of Medical Microbiology 56:1393-1398.
- WILLIAMS DW, JORDAN RPC, WEI X, ALVES CT, WISE MP, WILSON MJ, LEWIS MAO (2013). *Interactions of Candida albicans with host epithelial surfaces.* Journal of Oral Microbiology 5: 22434.
- YANG YL, LO HJ, HUNG CC, LI Y (2006). *Effect of prolonged HAART on oral colonization with Candida and candidiasis.* BMC Infectious Diseases 2006, 6:8.

Table 1: Medical and personal data from HIV and Control Groups

Personal Data	HIV Group (n= 43)	Control Group (n=17)
<i>Gender</i>	Male - 20 (46.52%) Female - 23 (53.48%)	Male - 9 (52.95%) Female - 8 (47.05%)
<i>Age (years)</i>	9,8 (±2.76)	8,9 (±2.40)
Oral Manifestation		
Candidiasis	23 (53.48%)	3 (17.64%)
Erythema	12 (27.90%)	3 (17.64%)
Herpes	12 (27.90%)	---
Hypertrophy	13 (30.23%)	---
Medical Data	HIV Group (n= 43)	
HAART use	Yes - 31 (72.09%) No - 12 (27.91%)	
Immunological classification**	1 – 27 (62.80%) 2 – 15 (34.88%) 3 - 1 (2.32%)	
AIDS***	Yes - 1 (2.32%) No - 42 (97.68%)	
Viral Load****	Detectable - 12 (27.91%) Undetectable - 31 (71.09%)	

*Use of three or more antiretroviral drugs (CDC, 1994).

1994 revised classification system for human Immunodeficiency Virus Infection in children less than 13 years of age (CDC): 1-absence of Immunessuppression (CD4%>25); 2-moderate Immunessuppression (CD4%=15-24); 3- severe Immunessuppression (CD4%<15). *CD4 < 15%.

****Viral Load detectable when <400 copies/ml

Table 2: Distribution and characterization of phospholipase production, protease production and susceptibility to Fluconazole of HIV and Control groups *Candida* spp. isolates.

PHOSPHOLIPASE PRODUCTION*					
	Not producer	Weak	Mild	Relatively Strong	Very Strong
HIV	28 (50.0%)	7 (12.5%)	7 (12.5%)	12 (21.4%)	2 (3.6%)
CONTROL	19 (82.7%)	1 (4.3%)	1 (4.3%)	2 (8.7%)	----
PROTEASE PRODUCTION*					
	Not producer	Weak	Mild	Relatively Strong	Very Strong
HIV	12 (21.4%)	----	2 (3.6%)	4 (7.1%)	38 (67.9%)
CONTROL	1 (4.3%)	----	----	2 (8.7%)	20 (87.0%)
SUSCEPTIBILITY TO FLUCONAZOLE**					
	Resistant	Susceptible		Sensitive	
HIV	24 (42.9%)	20 (35.7%)		12 (21.4%)	
CONTROL	9 (39.1%)	6 (26.1%)		8 (34.8%)	

* Categorization described by Dagdeviren *et al.* (2005). Isolates were classified, according to P_z , as not producer when $P_z=1$; weak producer when $0,99 \leq P_z \leq 0,90$; mild producer when $0,89 \leq P_z \leq 0,80$; relatively strong producer when $0,79 \leq P_z \leq 0,70$; and very strong when $0,69 \geq P_z$.

** Susceptibility to Fluconazole was classified according to the MIC values (NCCLS, 2002). MIC $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ (sensitive); $64 \mu\text{g/ml} \geq \text{MIC} > 8 \mu\text{g/ml}$ (susceptible); MIC $> 64 \mu\text{g/ml}$ (resistant)

Table 3: Distribution of *Candida* spp. isolates according to their species and phospholipase production, protease production and Fluconazole susceptibility categorization

<i>C. albicans</i>			non- <i>albicans Candida</i> ²			<i>C. parapsilosis</i>			<i>C. krusei</i>			
Mean (\pm SD) ¹	Producer	Not Producer	Mean (\pm SD) ¹	Producer	Not Producer	Mean (\pm SD) ¹	Producer	Not Producer	Mean (\pm SD) ¹	Producer	Not Producer	
PHOSPHOLIPASE*												
HIV	0.82 \pm 0.09	23 (69.7%)	10 (30.3%)	0.76 \pm 0.12	5 (21.7%)	18 (78.3%)	-----	-----	12 (100.0%)	0.80 \pm 0.07	4 (50.0%)	4 (50.0%)
CONTROL	0.83 \pm 0.06	4 (26.7%)	11 (73.3%)	-----	-----	8 (100.0%)	-----	-----	8 (100.0%)	-----	-----	-----
p-value	0.89	0.007		-----	0.19 – NS		-----	-----	-----	-----	-----	
PROTEASE*												
HIV	0.54 \pm 0.07	29 (87.9%)	4 (12.1%)	0.61 \pm 0.06	15 (65.2%)	8 (34.8%)	0.57 \pm 0.09	9 (75.0%)	3 (25.0%)	-----	5 (62.5%)	3 (37.5%)
CONTROL	0.53 \pm 0.06	14 (93.3%)	1 (6.7%)	0.48 \pm 0.09	8 (100.0%)	-----	0.52 \pm 0.06	8 (100.0%)	-----	-----	-----	-----
p-value	0.54	0.49 - NS		0.61	0.06 – NS		0.43	0.19 - NS		-----	-----	
SUSCEPTIBILITY TO FLUCONAZOLE**												
	SUSCEPTIBLE	RESISTANT		SUSCEPTIBLE	RESISTANT		SUSCEPTIBLE	RESISTANT		SUSCEPTIBLE	RESISTANT	
HIV	12 (36.4%)	21 (63.6%)		20 (87.0%)	3 (13.0%)		12 (100.0%)	0		6 (75.0%)	2 (25.0%)	
CONTROL	7 (46.7%)	8 (53.3%)		7 (87.5%)	1 (12.5%)		7 (87.5%)	1 (12.5%)		-----	-----	
p-value	NS			NS			NS			-----		

¹Mean Pz (\pm standard deviation); NS = Not significant (Mann-Whitney Test); ²Isolates of *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii* and *C. tropicalis* were aggregated as non-*albicans Candida*.

* Categorization described by Dagdeviren *et al.* (2005). Isolates were classified as producer when Pz < 1 and not producer when Pz=1;

** Susceptibility to Fluconazole was classified according to the MIC values (NCCLS, 2002), where MIC \leq 64 μ g/ml (susceptible) and MIC>64 μ g/ml (resistant).

5. DISCUSSÃO

Candida spp. são fungos que colonizam o ser humano desde o seu nascimento e podem permanecer por anos como comensais em vários sítios do corpo humano (ISSA *et al.*, 2011; CASSONE, 2013). Na cavidade bucal, esses micro-organismos são comumente encontrados no biofilme supragengival, língua, mucosa, palato, próteses dentárias, condutos radiculares e infecções gengivais (SÁNCHEZ-VARGAS *et al.*, 2013). Em indivíduos infectados pelo HIV, a instalação de candidíase oral reflete a progressão da doença para o estágio de sintomatologia moderada (CDC, 2008). Embora a candidíase mucosítica não seja letal, ela contribui para morbidade e redução da qualidade de vida de pacientes com AIDS (TAYLOR *et al.*, 2000). Além dos danos à cavidade oral, a *Candida* presente na cavidade bucal pode desencadear infecção em diversos sítios do corpo humano (JOBST & KRAFT, 2006). Assim, se torna muito relevante o entendimento da expressão de fatores de virulência de *Candida* spp. para que medidas preventivas e terapêuticas apropriadas sejam adotadas.

A frequência da morte de crianças infectadas pelo HIV menores de 15 anos tem diminuído em todo o mundo. O acesso ao HAART tem sido expandido, contribuindo com a redução de mortes e melhoras na qualidade de vida dessas crianças (UNAIDS, 2011). No Brasil, a incidência de infecção pelo HIV em mulheres tem aumentado proporcionalmente quando comparada a homens, de modo que a preocupação com a transmissão vertical é uma realidade em nosso país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Apesar do conhecimento sobre a patogenicidade de espécies de *Candida*, pouco se sabe sobre as peculiaridades da infecção em crianças soropositivas para HIV, de modo que sua elucidação é muito importante. Assim, de acordo com a literatura consultada até o momento, este é o primeiro estudo que buscou avaliar a formação de biofilme, produção de protease, produção de fosfolipase e a susceptibilidade ao Fluconazol de isolados *Candida* spp. da saliva de crianças infectadas pelo HIV na era do HAART.

Os isolados de *Candida* spp. utilizados na presente pesquisa foram previamente coletados da saliva de crianças infectadas pelo HIV e crianças sem

evidência clínica de imunossupressão por ALVES *et al.*, 2014 (in press). Sua identificação se deu por meio de técnicas amplamente utilizadas, que são o cultivo em CHROMagar Candida® (ODDS & BERNAERTS, 1994) e o sistema API 20C® (Biomérieux, Marcy L'Etoile, France). Métodos fenotípicos e bioquímicos não podem promover a distinção das espécies do complexo *C. parapsilosis*. Somente métodos moleculares como o PCR permitem a identificação dos membros deste complexo em *C. parapsilosis strictu sensu*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* (GARCIA-EFFRON *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2012), visto que diferenças em sequências de DNA podem diferenciá-las (TAVANTI *et al.*, 2005). Tais metodologias não foram realizadas quando da identificação das espécies dos nossos isolados. Apesar de filogeneticamente semelhantes, os estudos mostram resultados contraditórios em relação as diferenças relacionadas à prevalência clínica e à expressão de fatores de virulência do complexo *C. parapsilosis* (GARCIA-EFFRON *et al.*, 2012; NÉMETH *et al.*, 2013). Abi-chacra *et al.* (2013) ao desenvolver um estudo sobre a virulência de isolados clínicos de *C. parapsilosis strictu sensu*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, não observaram diferença significativa na expressão de fatores de virulência entre essas espécies. A adesão aos tecidos do hospedeiro é a fase inicial para a colonização e posterior infecção por *Candida* spp. (BENDEL & HOSTETTER, 1993). Após a adesão inicial, a capacidade de formação de biofilme é um importante fator de virulência de *Candida* spp. (LUCA *et al.*, 2012). Em nosso estudo, todos os isolados de *C. albicans* recolhidos da saliva de crianças infectadas pelo HIV e de crianças sem evidências clínicas de imunossupressão apresentaram a capacidade de formar biofilme *in vitro*, característica envolvida na patogênese das doenças causadas por esses micro-organismos (SARDI *et al.*, 2013). A organização em biofilme também confere a este fungo menor susceptibilidade a antimicrobianos (MATHÉ & DIJCK, 2013).

Nos últimos 20 anos, houve alterações na epidemiologia de *Candida* spp. em pacientes com candidíase. Proporcionalmente, houve aumento da frequência de espécies de *Candida* não-*albicans* quando comparado à frequência de *C. albicans* em isolados de pacientes com candidíase (YAPAR, 2014). Tumbarello *et al.* (2007) avaliaram a frequência de formação de biofilme em isolados de *Candida* spp. provenientes da corrente sanguínea de pacientes internados com cultura de sangue positiva para *Candida* spp. durante os anos de 2000 a 2004. Eles observaram a

manutenção da frequência de formação de biofilme por isolados de *C. albicans* e aumento na frequência de formação de biofilme por espécies de *Candida* não-*albicans*. Semelhantemente à *C. albicans*, todos os isolados de *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii* e *C. tropicalis* avaliados em nosso estudo foram positivos para a formação de biofilme, sugerindo que as espécies de *Candida* não-*albicans* podem ser patógenos importantes.

Quantitativamente, os isolados de *C. albicans* dos grupos HIV e controle, apresentaram maior capacidade de formar biofilme do que as outras espécies de *Candida*. Hawser e Douglas (1994) comparam a produção de biofilme por *Candida* spp. provenientes de processos infecciosos como infecções vaginais, infecções relacionadas a cateter em pacientes leucêmicos e implantes cardíacos infeccionados. Nesse estudo, eles observaram que *C. albicans* apresentava maior produção de biofilme do que *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. Ainda observaram que *C. krusei* produzia mais biofilme do que *C. albicans*. Em nosso estudo, os isolados de *C. krusei*, provenientes de crianças infectadas pelo HIV, apresentaram formação de biofilme predominantemente moderada, enquanto *C. albicans* (grupo HIV) mostrou uma formação de biofilme mais intensa (forte e moderada).

Tumbarello *et al.* (2007) observaram maior intensidade de formação de biofilme nos isolados de *C. tropicalis* quando comparado aos isolados de *C. parapsilosis* em isolados provenientes de infecção na corrente sanguínea de pacientes diabéticos ou que haviam sido submetidos a procedimentos cirúrgicos. Mane *et al.* (2013) estudaram a formação de biofilme por isolados orais de *Candida* de pacientes infectados pelo HIV e observaram maior produção de biofilme por *C. tropicalis*, seguido por *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. krusei*. Uma limitação do nosso estudo foi a de avaliar apenas um isolado de *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii* e de *C. tropicalis*, o que dificultou a comparação entre as espécies de *Candida* não-*albicans*. No entanto, todos estes isolados foram classificados como fortes produtores de biofilme, assim como a maioria dos isolados de *C. albicans*.

A comparação da formação de biofilme entre espécies de *Candida* por meio desta técnica é limitada devido à diferente capacidade que as espécies apresentam de metabolizarem o XTT (TUMBARELLO *et al.*, 2007; SÁNCHEZ-VARGAS *et al.*, 2013). Entretanto, um dos principais objetivos de nosso trabalho foi comparar a

produção de biofilme de isolados de crianças infectadas pelo HIV e crianças sem evidências clínicas de imunossupressão, e todas foram submetidas à mesma metodologia, de modo que tal objetivo não foi prejudicado. Outra técnica colorimétrica como a da redução do MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazólio Bromide), determinação da biomassa e a contagem de UFC são outras opções utilizadas para a análise da formação de biofilme (CHANDRA, MUKHERJEE & GHANNOUM, 2008; JUNQUEIRA *et al.*, 2011), entretanto a técnica do XTT apresenta maior sensibilidade.

As fosfolipases são enzimas produzidas por *Candida* spp. que estão relacionadas à digestão de lipídios para a aquisição de nutrientes e ao início do processo inflamatório não específico (SARDI *et al.*, 2013). O método utilizado neste estudo para a detecção da produção de fosfolipase seguiu os princípios descritos por Price *et al.* (1982). A gema de ovo foi utilizada como substrato por conter grande quantidade de fosfolipídios. À medida que a fosfolipase é produzida por *Candida* spp., ela age sobre os fosfolipídios presentes na gema do ovo, ocorre a liberação de ácidos graxos, que juntamente com o cálcio formam uma zona de precipitação esbranquiçada ao redor da colônia. Quando a cepa não é capaz de produzir fosfolipase, o halo ao redor da colônia não se forma (PRICE *et al.*, 1982; GHANNOUM, 2000). Esta técnica utilizando a gema de ovo como fonte de fosfolipídios tem sido amplamente utilizada para a detecção da produção dessa enzima (KANTARCIOGLU & YUCEL, 2002; MENEZES *et al.*, 2006; ABACI, 2011; MANE *et al.*, 2011;).

As fosfolipases produzidas pelos patógenos também tem como alvo a membrana celular do hospedeiro que é formada por fosfolipídios. Este mecanismo de digestão da membrana pode danificá-la e até mesmo levar à lise celular, destacando a relevância da produção de fosfolipase como fator de virulência de *Candida* spp. (BALLAL & MOHANDAS, 2011). Além de agir contra as células do hospedeiro, esta enzima atua no remodelamento da membrana celular e no controle do crescimento dos fungos (NIEWERTH & KORTING, 2001). No nosso trabalho, a atividade desta enzima foi significativamente maior nos isolados do grupo HIV. Mane *et al.* (2012) também observaram significativa produção de fosfolipase nos isolados orais de *Candida* spp. provenientes de indivíduos infectados pelo HIV, mas não

houve correlação entre a produção de enzima e a presença de candidíase, assim como em nosso estudo.

Ibrahim *et al.* (1995) desenvolveu um estudo relacionando a atividade de fosfolipase em isolados de infecções sanguínea, oral e vaginal com os de isolados orais de indivíduos assintomáticos. Embora cepas com produção deficiente de fosfolipase tenham danificado menos o endotélio (*in vitro*), nenhuma correlação entre a produção de fosfolipase e o dano às células endoteliais foi encontrado. Mesmo assim, devido ao seu potencial patogênico, estas enzimas têm se tornado um alvo terapêutico e diagnóstico, podendo ser alvo de novos antifúngicos (KANTARCIOGLU & YUCEL, 2002).

Niewerth e Korting (2001) relataram que a atividade de fosfolipase parecia estar limitada a *C. albicans*, assim como Ibrahim *et al.* (1995). Entretanto, a atividade desta enzima também tem sido detectada em outras espécies de *Candida* (COSTA *et al.*, 2010; RAMESH *et al.*, 2011; JUNQUEIRA *et al.*, 2012). Semelhantemente, em nosso estudo a atividade de fosfolipase foi detectada em *C. krusei* e *C. dubliniensis*, embora com maior frequência em *C. albicans*. COSTA *et al.* (2010) observaram atividade desta enzima em *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. tropicalis*. A frequência *in vitro* da atividade de fosfolipase dessas espécies foi menor quando comparada aos isolados de *C. albicans*. Entretanto, há um grande repertório de fatores de virulência de *Candida* spp. que conferem às espécies de *Candida* não-*albicans* elevado potencial virulento, o que é comprovado pelo aumento da frequência dessas espécies em processos infecciosos (KUMAR, KUMAR & MENON *et al.*, 2006; BASSETTI *et al.*, 2013).

As proteases são secretadas por espécies patogênicas de *Candida* e outras leveduras *in vivo* durante a infecção (CHAFFIN *et al.*, 1998). Essas enzimas apresentam baixa especificidade para substratos, podendo degradar diversas proteínas do tecido epitelial do hospedeiro, da matriz e da superfície celular (CASSONE & CAUDA, 2012). Neste estudo, os isolados de *Candida* spp. tiveram como fonte de nitrogênio a albumina sérica bovina, como relatado por Ruchel *et al.* (1982) e Oliveira *et al.* (1998). Técnicas utilizando a albumina sérica bovina como

fonte exógena de nitrogênio têm sido amplamente utilizadas para detectar a atividade de protease por esses micro-organismos (MENEZES *et al.*, 2006; TSANG *et al.*, 2007; ABACI, 2011; MANE *et al.*, 2012).

Em nosso estudo, a atividade da protease foi detectada na grande maioria dos isolados dos grupos HIV e controle. Ollert *et al.* (1995) analisaram a atividade desta enzima em isolados orais provenientes de lesões orais e regiões não lesionadas. Nesse estudo, a média da atividade de protease no grupo HIV foi quase o dobro da média do grupo controle. Mane *et al.* (2012) observaram uma maior expressão e atividade de protease em pacientes infectados pelo HIV quando comparado a pacientes sem sinais clínicos de imunossupressão. Em seu estudo, os isolados de *Candida* do grupo HIV foram coletados diretamente de lesões de candidíase bucal quando presentes (cerca de 33% dos isolados produtores de protease do grupo HIV), enquanto nenhum dos isolados do grupo controle foi proveniente de lesão oral. Em nosso estudo, os isolados de ambos os grupos foram coletados da saliva total e não de lesões orais. A diferença na frequência de protease entre os grupos não foi significativa.

Costa *et al.* (2010) realizaram um estudo com isolados de *Candida* spp. provenientes da cavidade oral de indivíduos infectados pelo HIV, de cateteres e do sangue de pacientes não infectados pelo HIV em tratamento na unidade de terapia intensiva. Considerando os isolados orais de *Candida*, a atividade de protease foi detectada em 93,5% dos isolados de *C. albicans* e em 44,4% dos isolados de *Candida* não-*albicans*. Em nosso estudo, a frequência de detecção da atividade de protease de todos os isolados de *C. albicans* (grupos HIV e controle) foi de 89,6% e a de *Candida* não-*albicans* foi de 74%. KUMAR, KUMAR e MENON (2006) também observaram a maior frequência de produção de protease por *C. albicans* quando comparada a outras espécies.

A produção de protease foi detectada em 85,0% dos nossos isolados de *C. parapsilosis* dos grupos HIV e controle e de 62,5% dos isolados de *C. krusei*. Costa *et al.* (2010) observaram maior frequência de produção desta enzima em isolados de *C. krusei* quando comparado a *C. parapsilosis*. A alta frequência de produção de protease por *C. parapsilosis* também foi observada por Abi-chacra *et al.* (2013), afirmando a importância desta enzima para sua virulência desta espécie, embora a

expressão de protease por *Candida* spp. esteja relacionada a diversos fatores, condições e estágio de infecção (KUMAR, KUMAR e MENON, 2006).

As condições do ambiente, incluindo o pH do meio parece agir diretamente sobre a síntese de protease (CHAFFIN *et al.*, 1998). Embora a xerostomia, mudanças na composição salivar e baixo pH sejam comumente observados em indivíduos infectados pelo HIV (o que poderia favorecer a ação da protease), a maior expressão dessa enzima não provocou maior incidência de candidíase oral no estudo de MANE *et al.* (2012). No nosso estudo, a correlação entre essa enzima e a presença/ histórico de lesões orais não foi observada. No entanto, é importante salientar que a indução e quantificação de protease dos isolados foi realizada *in vitro*, o que pode justificar a falta de correlação. Na literatura consultada, as pesquisas têm demonstrado resultados contraditórios e por isso pouco conclusivos. KOGA-ITO *et al.* (2006) observaram maior expressão de protease em isolados orais de *C. albicans* de pacientes usuários de prótese dentária com candidíase oral, enquanto os isolados de pacientes usuários de prótese sem a presença de doença também apresentavam expressão de protease. Ollert *et al.* (1995) não observaram correlação entre o estágio de infecção pelo HIV e o aumento da atividade de protease, assim como em nosso estudo. Mesmo que a expressão de protease, por si só, não seja determinante para a instalação de infecções por *Candida* spp., inibidores dessas enzimas são recursos que podem ser utilizados para impedir a instalação e progressão de infecções (GAUWERKY, BORELLI & KORTING, 2009).

Dentre os agentes antifúngicos utilizados no tratamento de infecções mucosíticas e sistêmicas por *Candida* spp., um dos principais e de primeira escolha é o fluconazol. Como medicamento da família dos azóis, esta droga inibe a formação do ergosterol, um importante componente da membrana celular fúngica, promovendo assim a sua descontinuidade. Por agir especificamente na membrana fúngica, não interagindo com a membrana das células do hospedeiro, este medicamento tem sido utilizado de maneira tópica e no tratamento/ profilaxia de infecções fúngicas invasivas (SPAMPINATO & LEONARDI, 2013). Devido à relevância deste medicamento no tratamento da candidíase bucal de pacientes infectados pelo HIV, a susceptibilidade de *Candida* spp. ao mesmo foi avaliada em nosso estudo.

Há muitos métodos utilizados para testar a sensibilidade a antifúngicos, como a microdiluição, E-teste, citometria, corantes de viabilidade e diluição em agar (PREMKUMAR *et al.*, 2014). Em nosso estudo, utilizamos a técnica de microdiluição descrita pelo CLSI/NCCLS (2002). Nesta técnica, ocorre a exposição dos isolados de *Candida* a diversas concentrações do fluconazol e posterior análise, após incubação por 48 horas. Para detectar se houve crescimento desses microorganismos durante esse período, ocorre a resuspensão celular e leitura em espectrofotômetro. O comprimento de onda selecionado para a leitura da placa do experimento se dá de acordo com o meio de cultura utilizado (neste caso, o meio de cultura sintético RPMI 1640 com ácido hidroxietilpiperazina etanossulfônico) para que o mesmo não venha interferir na leitura final. Este método instituído para testar leveduras causadoras de infecções invasivas, como *Candida* spp., se propõe a padronizar o teste de susceptibilidade a antifúngicos para que haja uma concordância e comparabilidade dos resultados nos laboratórios que o executam. Além disso, este método apresenta vantagens como ser de fácil execução, econômico e fornecer resultados em um curto período de tempo (48 horas) (CLSI/NCCLS, 2002).

Maenza *et al.* (1996), em seu trabalho acerca dos fatores de risco da candidíase oral e esofágica causada por cepas resistentes ao fluconazol em pacientes infectados pelo HIV, demonstraram a importância da imunossupressão e da exposição a azóis orais no desenvolvimento de resistência a tal medicação. Indivíduos apresentando um quadro de imunossupressão avançada eram mais expostos à terapia com azóis e por isso desenvolviam mais resistência a essas medicações (MAENZA *et al.*, 1996). Poucos isolados provenientes de crianças com imunossupressão grave foram utilizados em nosso estudo, entretanto houve uma frequência alta de resistência ao fluconazol nos grupos HIV e controle. Em nosso trabalho, a correlação entre a presença de candidíase oral no momento da lesão/histórico de candidíase e a resistência ao fluconazol não foi detectada.

Ao avaliar nossos resultados, não foi observada correlação entre a infecção pelo HIV e a resistência ao fluconazol, visto que sua frequência foi semelhante nos isolados de *Candida* spp. de crianças infectadas pelo HIV e em crianças sem evidência clínica de imunossupressão. Ramesh *et al.* (2011) detectaram alta frequência de isolados de *C. albicans* resistentes ao fluconazol. Em seu estudo não

houve diferença significativa quanto à resistência ao fluconazol de isolados de indivíduos imunossuprimidos (HIV e tuberculose) e indivíduos saudáveis com idade entre 18 e 60 anos. A resistência de *C. albicans* aos azóis tem crescido em relação aos pacientes imunossuprimidos e sem evidência de imunossupressão (RAMESH. *et al.* 2011).

Ao comparar cepas de *Candida* spp. isoladas de lesão de candidíase oral entre os anos de 2006-2007 com as de 2012-2013, Kamikawa *et al.* (2014) detectaram uma diminuição da sensibilidade de algumas espécies de *Candida* não-*albicans* ao fluconazol. Premkumar *et al.* (2014) observaram uma variação significativa da susceptibilidade ao fluconazol entre as diferentes espécies de *Candida* não-*albicans* isoladas da cavidade oral de pacientes diabéticos. Eles não detectaram resistência a este medicamento em nenhum isolado de *C. albicans*. Já em nosso estudo, a resistência ao fluconazol foi detectada em 60,4% dos isolados de *C. albicans* e somente em 12,9% dos isolados de espécies de *Candida* não-*albicans*. Este é um dado preocupante, visto que embora a proporção de espécies de *Candida* não-*albicans* tenha emergido nas últimas décadas como cepas com potencial patogênico, *C. albicans* continua sendo a espécie mais prevalente em infecções (KAMIKAWA *et al.*, 2014).

Embora o fluconazol seja um agente antifúngico importante, o seu uso repetitivo e a duração do tratamento podem levar ao aumento da incidência de resistência à sua ação (SCHULZ *et al.*, 2011). A resistência a antifúngicos pode estar associada a diversos mecanismos celulares (SPAMPINATO & LEONARDI, 2013) e em nossa pesquisa foi detectada em isolados de crianças cujos responsáveis não relataram uso prévio de antifúngicos. Ben-Ami *et al.* (2012), através de um estudo retrospectivo, avaliaram a associação entre a resistência ao fluconazol de isolados de *Candida* spp. provenientes de infecção na corrente sanguínea com o uso prévio de antibacterianos (pelo menos 30 dias antes do desenvolvimento da candidemia). Estes autores por meio de uma análise multivariada puderam sugerir que o uso inadequado de antibióticos (cefalosporina, clindamicina, sulfametazona e trimetropim com sulfametazona) pode promover a seleção de cepas invasivas de *Candida* resistentes ao fluconazol. Como o uso extensivo de antibióticos em crianças é um problema de saúde pública mundial (ALUMRAN, HOU & HURST, 2013), acreditamos que a elevada frequência de

resistência ao fluconazol entre os isolados de *C. albicans* também possa estar relacionado a este fato. Os antibacterianos são amplamente utilizados desde os primeiros meses de vida por crianças infectadas pelo HIV de forma profilática contra infecções bacterianas, como a pneumonia, que consiste em um dos sinais clínicos iniciais de infecção pelo HIV em bebês (CDC, 1991). Além do fluconazol, há outras classes de antifúngicos que podem servir como drogas alternativas nos casos de resistência. No entanto, por tratar-se de pacientes infantis e em uso de antivirais, este arsenal fica muito limitado, por isso o desenvolvimento de novas formulações e compostos para o tratamento de infecções por *Candida* spp. resistentes ao fluconazol é de suma importância (SPAMPINATO & LEONARDI, 2013).

Como parte da microbiota normal dos seres humanos, *Candida* spp. são comumente encontradas na mucosa da cavidade oral, trato gastrointestinal e na vagina (SARDI *et al.*, 2013). Quando em comensalismo, a colonização se dá sob a forma de levedura e esta relação com o hospedeiro favorece o equilíbrio da microbiota e a manutenção da homeostase imune (CASSONE, 2013). Em pacientes infectados pelo HIV as infecções por espécies de *Candida* são tão relevantes que as lesões de candidíase esofágica configura um quadro clínico da instalação da AIDS nesses indivíduos, assim como a sua evolução (CASSONE & CAUDA, 2012). Considerando ainda a vulnerabilidade imunológica das crianças infectadas pelo HIV, o melhor entendimento das interações patógeno-hospedeiro é muito relevante para que a instalação de infecções invasivas seja evitada. Como a candidíase é mais frequente em indivíduos imunossuprimidos (CHAGAS *et al.*, 2009; CERQUEIRA *et al.*, 2010), a gravidade da doença vinha sendo relacionada à deficiência imune desses indivíduos e não as características do patógeno oportunista (OLLERT *et al.*, 1995). Embora alterações no estado do hospedeiro sejam normalmente necessárias para o estabelecimento de candidíase (HAYNES, 2001), o melhor entendimento da expressão de diversos fatores de virulência de *Candida* spp. no estabelecimento da doença é fundamental, especialmente em crianças, que apresentam o sistema imune ainda imaturo (PINHEIRO *et al.*, 2009).

Há a teoria que afirma que o grau de imunossupressão produz um ambiente favorável para a expressão acentuada dos fatores de virulência de *Candida* spp. (CASSONE & CAUDA, 2012). Receptores presentes em *C. albicans* interagem com receptores de células dos tecidos do hospedeiro. Uma cascada de sinalizações

ocorre no interior dessas células, levando à produção de citocinas e diferenciação de células T-helper. A ativação das células T normalmente desencadeia uma resposta inflamatória, que envolve fatores humorais e a imunidade inata (macrófagos e neutrófilos), além de levar à produção de anticorpos específicos (CASSONE, 2013). Diante do desequilíbrio imunológico, a interação fungo-hospedeiro fica prejudicada, levando ao crescimento da população de *Candida* e ao início da infecção, visto que estes micro-organismos detectam e respondem a mudanças ambientais rapidamente (CALDERONE & FONZI, 2001; HAYNES, 2001).

Com exceção da fosfolipase, os resultados da presente pesquisa não demonstraram diferenças significativas com relação aos fatores de virulência de *Candida* spp., entre os grupos estudados. Todos os isolados analisados foram submetidos às mesmas condições de cultivo *in vitro* e isso pode ter influenciado nos resultados obtidos. Já as condições *in vivo* são totalmente diferentes nos grupos estudados (imunossupressão, uso de antibacterianos e antifúngicos, episódios de internações), o que deve determinar o desenvolvimento da infecção fúngica.

Acreditamos que os isolados de *Candida* spp. coletados de crianças infectadas pelo HIV apresentem maior potencial de expressar fatores de virulência e que a imunossupressão exerça um papel regulador sobre essa expressão *in vivo*. Assim, mais estudos devem ser desenvolvidos a fim de monitorar a expressão dos fatores de virulência de *Candida* spp. ao longo das fases de infecção pelo HIV em crianças para que os mecanismos desencadeadores da doença sejam identificados, permitindo a instituição de métodos eficazes de prevenção e tratamento de infecções oportunistas em crianças infectadas pelo HIV.

6. CONCLUSÕES

- Não houve diferença significativa entre os fatores de virulência formação de biofilme, produção de protease e susceptibilidade ao Fluconazol de *Candida* spp. isoladas da saliva de crianças infectadas pelo HIV com os isolados de crianças clinicamente saudáveis, *in vitro*. Houve aumento significativo da frequência de expressão de fosfolipase nos isolados do grupo HIV.
- Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos HIV e controle em relação à frequência de formação de biofilme. Isolados de *Candida* spp. de crianças infectadas pelo HIV não apresentaram diferença significativa na intensidade de formação de biofilme em relação aos isolados de crianças clinicamente saudáveis.
- Diferenças significativas em relação à frequência de produção de fosfolipase foram encontradas entre os grupos. Isolados de *C. albicans* provenientes de crianças infectadas pelo HIV apresentaram uma maior frequência de produção de fosfolipase em relação ao grupo clinicamente saudável. Assim como maior intensidade de produção desta enzima. Quanto às outras espécies de *Candida*, nenhuma diferença significativa foi observada entre os dois grupos.
- Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos HIV e clinicamente saudável em relação à produção de protease. Isolados de *Candida* spp. de crianças infectadas pelo HIV não apresentaram diferença significativa na intensidade de produção de protease em relação ao grupo clinicamente saudável ($p>0,05$).
- Nenhuma diferença significativa em relação à susceptibilidade ao Fluconazol foi encontrada entre os isolados de *Candida* spp. dos grupos HIV e clinicamente saudável.
- Considerando a expressão dos fatores de virulência dos isolados de *Candida* spp. provenientes da saliva de crianças do grupo HIV, não houve correlação com o uso de medicamentos antirretrovirais, grau de imunossupressão (percentual de linfócitos CD4), presença de AIDS e carga viral.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABACI, O (2011). *Investigation of extracellular phospholipase and proteinase activities of Candida species isolated from individuals denture wearers and genotypic distribution of Candida albicans strains*. Cur Microbiol 62: 1308-1314.

ABI-CHACRA EA, SOUZA LOP, CRUZ LP, BRAGA-SILVA LA *et al.* (2013). *Phenotypical properties associated with virulence from clinical isolates belonging to the Candida parapsilosis complex*. FEMS Yeast Res 13:831-48.

ALUMRAN A, HOU XY, HURST C (2013). *Assessing the overuse of antibiotics in children in Saudi Arabia: validation of the parental perception on antibiotics scale (PAPA scale)*. Health and Quality of Life Outcomes, 11:39.

ÁLVARO-MECA A, JENSEN J, MICHELOUD D, DÍAZ A, GURBINDO D, RESINO S (2013). *Rate of candidiasis among HIV-infected children in Spain in the era of highly active antiretroviral therapy (1997–2008)*. Infectious Diseases 13:115.

ALVES TPA, SIMÕES ACDC, SOARES RMA, MORENO DAS, PORTELA MB, CASTRO GFBA (2014). *Salivary lactoferrin in HIV-infected children: Correlation with Candida albicans carriage, oral manifestations, HIV infection and its antifungal activity*. Archives of Oral Biology (59): 775-782.

ÁSMUNDSDÓTTIR LR *et al.* (2009). *The importance of strain variation in virulence of Candida dubliniensis and Candida albicans: results of a blinded histopathological study of invasive candidiasis*. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 15:576-585.

BADIEE P, ALBORZI A (2011). *Susceptibility of clinical Candida species isolates to antifungal agents by E-test, Southern Iran: a five year study*. Iranian Journal of Microbiology. 4:183-188.

BADIEE P, ALBORZI A, DAVARPANAH MA, SHAKIBA E (2010). *Distributions and antifungal susceptibility of Candida species from mucosal sites in HIV positive patients*. Arch Iran Med 13(4):282-87.

BALAKRISHNAN S *et al.* (2009). *Alternative paths in HIV-1 targeted human signal transduction pathways*. BMC Genomics v.10(3).

BALLAL M, MOHANDAS V (2011). *Distribution of Candida species in different clinical samples and their virulence: Biofilm formation, proteinase and phospholipase production: a study on hospitalized patients in Southern India*. Jour Glob Infec Dis Jan-Mar p.4 report.

BASSETI M, MERELLI M, RIGHI E, DIAZ-MARTIN A, ROSELLO EM, LUZZATI R, PARRA A, TRECARICHI EM, SANGUINETTI M *et al.* (2013). *Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility, and outcome of candidemia across five sites in Italy and Spain*. J Clin Microbiol Dec 51(12):4167-72.

BEN-AMI R, *et al.* (2012). *Antibiotic Exposure as a Risk Factor for Fluconazole-Resistant Candida Bloodstream Infection*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 6 February; p. 2518-2523.

BENDEL CM, HOSTETTER MK (1993). *Distinct Mechanisms of Epithelial Adhesion for Candida albicans and Candida tropicalis - Identification of the Participating Ligands and Development of Inhibitory Peptides*. *J. Clin. Invest.* 92:1840-1849.

BONHOMME J, D'ENFERT C (2013). *Candida albicans biofilms: building a heterogeneous drug-tolerant environment*. *Current Opinion in Microbiology* 16:398-403.

CALDERONE RA, FONZI WA (2011). *Virulence factors of Candida albicans*. *Trends in Microbiology*. 9(7): p. 327-35.

CANTÓN E, PEMÁN J, QUINDÓS G, ERASO E, MIRANDA-ZAPICO I, ÁLVAREZ M, MERINO P, CAMPOS-HERRERO I, MARCO F (2011). *Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification and antifungal susceptibility of Candida parapsilosis, Candida orthopsilosis and Candida metapsilosis isolated from patients with candidemia*. *Antimicrob Agents Chemoter* 55:5590-96.

CASSONE A (2013). *Development of vaccines for Candida albicans: fighting a skilled transformer*. *Nature Reviews*. Vol 11; p. 884-891.

CASSONE A, CAUDA R (2012). *Candida and candidiasis in HIV-infected patients: where commensalism, opportunistic behavior and frank pathogenicity lose their borders*. *AIDS*, 26:1457–72.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention (1991). *Guidelines for Prophylaxis Against Pneumocystis carinii Pneumonia for Children Infected with Human Immunodeficiency Virus*. *Recommendations and Reports MMWR*. March 15, 1991 / 40(RR02);1-13.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention (1994). *Revised classification system for Human Immunodeficiency Virus Infection in children less than 13 years of age*. *MMWR* 43:1-19.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention (2008). *Introduction to HIV/ AIDS – Generic Training Package Participant Manual*. Module 1. Disponível em: www.unaids.org. Acesso em 20 de janeiro de 2014.

CERQUEIRA DF, PORTELA MB, POMARICO L, SOARES RMA, SOUZA IPR, CASTRO GF (2010). *Oral Candida colonization and its relation with predisposing factors in HIV-infected children and their uninfected siblings in Brazil: the era of highly active antiretroviral therapy*. *J Oral Pathol Med* 39:188-194.

CHAFFIN WL *et al.* (1998). *Cell wall and secreted proteins of Candida albicans: Identification, Function, and expression*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62: 130-180.

CHAGAS MS, PORTELA MB, CERQUEIRA DF, SOUZA IPR, SOARES RM, CASTRO GF (2009). *Reduction of Candida species colonization in the oral cavity of*

children infected with human immunodeficiency virus after dental treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 108: 383-38.

CHANDRA J, MUKHERJEE PK, GHANNOUM MA (2008). *In vitro growth and analysis of Candida biofilm*. *Nat. Protocol* 3,1909–1924.

CHAVES GM, DINIZ MG, SILVA-ROCHA WP, LBFN SOUZA, GONDIM LAM *et al.* (2013). *Species Distribution and Virulence Factors of Candida spp. Isolated from the Oral Cavity of Kidney Transplant Recipients in Brazil*. *Mycopathologia* 175:255–263.

CLSI (2002). *Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada—Segunda Edição*. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos.

COSTA CR, PASSOS XS, SOUZA LKH, LUCENA PA, FERNANDES OFL, SILVA MRR (2010). *Differences in exoenzyme production and adherence ability of Candida spp. isolates from catheter, blood and oral cavity*. *Rev. Inst. Med. Trop.* 52(3):139-143, May-June.

COSTA, ACBP *et al.* (2012). *Effect of erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy on buccal candidiasis infection of immunosuppressed mice and Candida albicans adherence to buccal epithelial cells*. *Oral Medicine* Vol. 114 No. 1.

CUÉLLAR-CRUZ M *et al.*, (2012). *The effect of biomaterials and antifungals on biofilm formation by Candida species: a review*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. Published on line: 12 May.

DAGDEVIREN M, CERIKCIOGLU N, KARAVUS M (2005). *Acid proteinase, phospholipase and adherence properties of Candida parapsilosis strains isolated from clinical specimens of hospitalized patients*. *Mycoses*, v. 48, p. 321–326.

DIAS EP *et al.* (2006). *Prevalence of oral hairy leukoplakia in 120 pediatric patients infected with HIV-1*. *Braz Oral Res* 20(2):103-7.

DOMANESCHI C, MASSARENTE DB, FREITAS RS, MARQUES HHS, PAULA CR, MIGLIARI DA, ANTUNES JL (2011). *Oral colonization by Candida species in AIDS pediatric patients*. *Oral Dis*, 17(4):393-8.

EVANS D, MASKEW M, SANNE I (2012). *Increased risk of mortality and loss to follow-up among HIV-positive patients with oropharyngeal candidiasis and malnutrition prior to ART initiation – A retrospective analysis from a large urban cohort in Johannesburg, South Africa*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. March ; 113(3): 362–372.

FARIA, TPA (2013). *Lactoferrina salivar e sua atividade antifúngica sobre Candida albicans isoladas da cavidade oral de crianças infectadas pelo HIV Dissertação (mestrado) - UFRJ, FO, Programa de Pós-graduação em Odontologia, Odontopediatria, 2013.*

FINKEL JS, MITCHELL AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development (2011). *Nature reviews Microbiology*, Feb 9:109-118

GARCIA-EFFRON G, CANTON E, PEMÁN J, DILGER A, ROMÁ E, PERLIN DS (2011). *Assessment of two new molecular methods for identification of Candida parapsilosis sensu lato species*. *Journal of Clinical Microbiology* 49(9): 3257-61.

GARCIA-EFFRON G, CANTON E, PEMÁN J, DILGER A, ROMÁ E, PERLIN DS (2012). *Epidemiology and echinocandin susceptibility of Candida parapsilosis sensu lato species isolated from bloodstream infections at a Spanish university hospital*. *Journal of Antimicrobiol Chemotherapy* 67(11): 2739-48.

GAUWERKY K, BORELLI C, KORTING HC (2009). *Targeting virulence: a new paradigm for antifungals*. *Drug Discov Today*., 14(3-4), 214-22.

GHANNOUM MA (2000). *Potential Role of Phospholipases in Virulence and Fungal Pathogenesis*. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 13, n. 1, p. 122-143.

HAMZA OJM *et al.* (2008). *Species distribution and in vitro antifungal susceptibility of oral yeasts isolates from Tanzanian HIV-infected patients with primary and recurrent oropharyngeal candidiasis*. *BMC Microbiology* 8:135.

HASANA F, XESSA I, WANGC X, JAINC N, FRIES BC (2009). *Biofilm formation in clinical Candida isolates and its association with virulence*. *Microbes Infect* 11: 753–61.

HAWSER SP, DOUGLAS LJ (1994). *Biofilm formation by Candida species on the surface of catheter materials in vitro*. *Infect. Immun.* 62(3):915.

HAYNES K (2001). *Virulence in Candida species*. *Trends in Microbiology* 9(12): p. 591-6.

HEITMAN, J (2011). *Microbial pathogens in the fungal kingdom*. *Fungal Biol Rev.* March 1; 25(1): 48–60.

HUANG M *et al.* (2011). *Evolutionary Dynamics of Candida albicans during In Vitro Evolution*. *Eukaryotic Cell*, Nov. p. 1413–1421.

IBRAHIM AS *et al.* (1995). *Evidence Implicating Phospholipase as a Virulence Factor of Candida albicans*. *Infection and Immunity*, May, p. 1993–98.

IBRAHIM AS *et al.* (1998). *Secreted aspartyl proteinases and interactions of Candida albicans with human endothelial cells*. *Infect. Immun.* 66:3003–3005.

ISSA S, BADRAN EF, AKL KF, SHEHABI AA (2011). *Epidemiological characteristics of Candida species colonizing oral and rectal sites of Jordanian infants*. *BMC Pediatrics* 2011, 11:79.

JAIN PA, VEERABHADRU K, KULKARNI RD, AJANTHA GS, SHUBHADA C, AMRUTHKISHAN U (2010). *Comparative study of adherence of oral Candida albicans isolates from HIV sero-positive individuals and HIV sero-negative individuals to human buccal epithelial cells*. *Indian J Pathol Microbiol* 53: 513–7.

- JEDDY N *et al.* (2011). *A study of antifungal drug sensitivity of Candida isolated from human immunodeficiency virus infected patients in Chennai, South India.* J Oral Maxillof Pathol. May-August 15 (2): 182-186.
- JIN Y, YIP HK, SAMARANAYAKE H, YAU JY, SAMARANAYAKE LP (2003). *Biofilm-Forming Ability of Candida albicans Is Unlikely To Contribute to High Levels of Oral Yeast Carriage in Cases of Human Immunodeficiency Virus Infection.* JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 41(7): p. 2961–7.
- JOBST D, KRAFT K (2006). *Candida species in stool, symptoms and complaints in general practice - a cross-sectional study of 308 outpatients.* Mycoses, Sep;49(5):415-20.
- JUNQUEIRA J.C *et al.* (2011). *Oral Candida albicans isolates from HIV-positive individuals have similar in vitro biofilm-forming ability and pathogenicity as invasive Candida isolates.* BMC Microbiol 11: 247.
- JUNQUEIRA JC, VILELA SFG, ROSSONI RD, BARBOSA JO *et al.* (2012). *Oral colonization by yeasts in HIV-positive patients in Brazil.* Rev. Inst. Med. Trop. 54(1):17-24, January-February.
- KAMIKAWA Y, *et al.* (2014). *Frequency of clinically isolated strains of oral Candida species at Kagoshima University Hospital, Japan, and their susceptibility to antifungal drugs in 2006–2007 and 2012–2013.* BMC Oral Health. 14:14.
- KANTARCIOGLU SA, YUCEL A (2002). *Phospholipase and protease activities in clinical Candida isolates with reference to the sources of strains.* Mycoses 45: 160-165.
- KIERTIBURANAKUL S *et al.* (2014). *Trends of CD4 cell count levels at the initiation of antiretroviral therapy over time and factors associated with late initiation of antiretroviral therapy among Asian HIV-positive patients.* Jour Int AIDS Soc 17:18804.
- KOGA-ITO CY *et al.* (2006). *Virulence Factors and antifungal susceptibility of Candida albicans isolates from oral candidiasis patient and control individuals.* Mycopathologia 161:219-23.
- KUMAR CPG, KUMAR SSJ, MENON T (2006). *Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of Candida from immunocompromised patients .* Mycopathologia 161: 213–218.
- LATTIF AA, MUKHERJEE PK, CHANDRA J, SWINDELL K, LOCKHART SR *et al.* (2010). *Characterization of biofilms formed by C. parapsilosis, C. metapsilosis and C. orthopsilosis.* Int Jour Med Mic 300: 265-70.
- LI J *et al.* (2012). *Biofilm formation of Candida albicans on implant overdenture materials and its removal.* Journal of Dentistry 40(8): p. 686-92.
- LUCA CD, GUGLIELMINETTI M, FERRARIO A, CALAVRÒ M, CASSARI E (2012). *Candidemia: species involved, virulence factors and antimycotic susceptibility.* New Microb 35:459-69.

- MAENZA JR *et al.* (1996). *Risk Factors for Fluconazole-Resistant Candidiasis in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients*. *The Jour Infec Dis* 173 (1): 219-25.
- MANE A, PAWALE C, GAIKWAD S, BEMBALKAR S, RISBUD A (2011). *Adherence to buccal epithelial cells, enzymatic and helolytic activities of Candida isolates from HIV-ifected individuals*. *Medical Mycology* 49: 548-51.
- MANE A, GAIKWAD S, BEMBALKAR S, RISBUD A (2012). *Increased expression of virulence attributes in oral Candida albicans isolates from human immunodeficiency virus-positive individuals*. *J Med Microbiol* 61(pt 2): p. 285–90.
- MANE A, KULKARNI A, RISBUD A (2013). *Biofilm production in oral Candida isolates from HIV-positive individuals from Pune, India*, *Mycoses* 56: 182–6.
- MARTINEZ L.R., FRIES B.C (2010). *Fungal biofilms: relevance in the setting of human disease*. *Curr Fungal Infect Rep* 4(4): p. 266–75.
- MATHÉ L, DIJCK PV (2013). *Recent insights into Candida albicans biofilm resistance mechanisms*. *Curr Genet* 59:251-64.
- MAYER FL, WILSON D, HUBE B (2013). *Candida albicans pathogenicity mechanisms*. *Virulence* 4(2):119–28.
- MENEZES EA *et al.* (2006). *Frequency and enzymatic activity of Candida albicans isolated from the oral cavity of HIV-positive patients at Fortaleza, Ceará*. *J Bras Patol Med Lab* 42(4):253-256.
- MICELI, MH, DÍAZ, JA, LEE AS (2011). *Emerging opportunistic yeast infections*. *Lancet Infect Dis*. Fevereiro. Vol. 11: 142–51.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (2001). *Boletim epidemiológico AIDS-DST* (referente a julho/dezembro de 2010 e janeiro/julho de 2011), p. 9-10. Acesso em 22 de janeiro de 2014. Disponível em www.aids.gov.br
- MOHAN V, BALLAL M (2008). *Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in Candida species isolated from blood*. *Rev Iberoam Micol*; 25: 208-210.
- NAGLIK JR *et al.* (2003). *Differential Expression of Candida albicans Secreted Aspartyl Proteinase and Phospholipase B Genes in Humans Correlates with Active Oral and Vaginal Infections*. *The Journal of Infectious Diseases* 188:469–79.
- NAGLIK JR, CHALLACOMBE SJ, HUBE B (2003). *Candida albicans Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67(3):400.
- NAIDOO, S. e CHIKTE, U (2004). *Oro-facial manifestations in paediatric HIV: a comparative study of institutionalized and hospital outpatients*. *Oral Dis*. 10(1): p. 13-8.

- NÉMETH T, TÓTH A, SZENZENSTEIN J, HORVÁTH P, NOSANCHUK JD *et al.* (2013). *Characterization of virulence properties in the C. parapsilosis sensu lato species*. Plos one 8(7):e68704.
- NETT J, ANDES D (2006). *Candida albicans biofilm development, modeling a host–pathogen interaction*. Current Opinion in Microbiology, 9:340–345.
- NIWERTH M, KORTING HC (2001). *Phospholipases of Candida albicans*. Mycoses 44:361-67.
- NWEZE EI, OGBONNAYA UL (2011). *Oral Candida isolates among HIV-infected subjects in Nigeria*. Jour of Mic Imm Inf 44,172-177.
- ODDS FC, BERNAERTS R (1994). *CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important Candida species*. J Clin Microbio 32(8):1923-9.
- OLIVEIRA EE, SILVA SC, SOARES AJ, ATTUZ C, CRUVINEL B, SILVA MR (1998). *Toxinas killer e produção de enzimas por Candida albicans isoladas da mucosa bucal de pacientes com câncer*. Rev. Soc. Bras. Med Trop 31(6):523-527.
- OLLERT MW, WENDE C, GORLICH M, MCMULLAN-VOGEL CG *et al.* (1995). *Increased expression of Candida albicans secretory proteinase, a putative virulence factor, in isolates from human immunodeficiency virus-positive patients*. J. Clin. Microbiol. 1995, 33(10):2543.
- PINHEIRO RS, FRANÇA TT, RIBEIRO CMB, LEÃO JC, SOUZA IPR, CASTRO GF (2009). *Oral manifestations in Human Immunodeficiency virus infected children in highly active antiretroviral therapy era*. J Oral Pathology 38:613-622.
- POMARICO L, CERQUEIRA DF, SOARES RMA, SOUZA IPR, CASTRO GFBA, SOCRANSKY S, HAFFAJEE A, TELES RP (2009). *Associations among the use of highly active antiretroviral therapy, oral candidiasis, oral Candida species and salivary immunoglobulin A in HIV-infected children*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. August ; 108(2): 203–210.
- PORTELA MB, SOUZA IP, ABREU CM, BERTOLINI M, HOLANDINO C, ALVIANO CS, SANTOS AL, SOARES RM (2010). *Effect of serine-type protease of Candida spp. isolated from linear gingival erythema of HIV-positive children: critical factors in the colonization*. J Oral Pathol Med. Nov 39(10):753-60.
- PREMKUMAR J, RAMANI P, CHANDRASEKAR T, NATESAN A, PREMKUMAR P (2014). *Detection of species diversity in oral candida colonization and anti-fungal susceptibility among non-oral habit adult diabetic patients*. Nat Sci Biol Med. Jan-Jun; 5(1): 148-154.
- PRICE MF, WILKINSON ID, GENTRY LO (1982). *Plate Method for Detection of Phospholipase Activity in Candida albicans*. Sabouraudia, 20:7-14.
- RAMESH N, PRIYADHARSINI M, SUMATHI CS, BALASUBRAMANIAN V, HEMAPRIYA J, KANNAN R (2011). *Virulence Factors and Anti Fungal Sensitivity*

Pattern of Candida Sp. Isolated from HIV and TB Patients. Indian J Microbiol (July–Sept) 51(3):273–278.

RAO MB, TANKSALE AM, GHATGE MS, DESHPANDE VV (1998). *Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases.* Mic Mol Biol Rev, Sept. 1998, p. 597–635.

RICHMOND GS, SMITH TK (2011). *Phospholipase A₁.* Int. J. Mol. Sci., 12, 588-612.

RUCHEL R, TEGELER R, TROST M (1982). *A Comparison of Secretory Proteinases from Different Strains of Candida albicans.* Sabouraudia, 20: 233-244.

SÁNCHEZ-VARGAS LO, ESTRADA-BARRAZA D, POZOS-GUILLEN AJ, RIVAS-CACERES R (2013). *Biofilm formation by oral clinical isolates of Candida species.* Archives of oral biology 58, 1320:1318–1326.

SARDI JCO, SCORZONI L, BERNARDI T, FUSCO-ALMEIDA AM, GIANNINI MJS (2013). *Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options.* Journal of Medical Microbiology, 62, 10–24 DOI 10.1099.

SCHMIDT-WESTHAUSEN AM (2000). *Decline in the rate of oral opportunistic infections following introduction of highly active antiretroviral therapy.* J Oral Pathol Med 29: 336–41.

SCHULZ B *et al.* (2011). *Difference in virulence between fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant Candida albicans in a mouse model.* Mycoses 54:e522-e530.

SHEEHAN DJ, HITCHCOCK CA, SIBLEY CM (1999). *Current and emerging Azole Antifungal Agents.* Clinical Microbiology Reviews, Jan. p. 40–79

SHIBOSKI CH *et al.* (2011). *Overview of the Oral HIV/AIDS Research Alliance Program.* Adv Dent Res 23(1), p.28-33.

SILVA RA, LOPES FF, BARRETO, AM (2002). *Estudo clínico das manifestações orais da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida Pediátrica.* RGO. Jan./Fev./Mar. v. 50, n. 1, p. 7-11.

SILVA-BOGHOSSIAN C *et al* (2008). *Salivary microbiota of HIV-positive children and its correlation with HIV status, oral diseases, and total secretory IgA.* International Journal of Paediatric Dentistry; 18: 205–216.

SOCRANSKY SS, HAFFAJEE AD (2002). *Dental biofilms: difficult therapeutic targets.* Periodontology 2000, 28:12-55.

SOUZA ACR, FERREIRA RC, GONÇALVES SS, QUINDÓS G, ELENA E, BIZERRA FC, BRIONES MRS, COLOMBO AL (2012). *Accurate identification of Candida parapsilosis (sensu lato) by use of mitochondrial DNA and Real-time PCR.* Journal of Clinical Microbiology 50(7): 2310-14.

- SPAMPINATO C, LEONARDI D (2013). *Candida Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents*. BioMed Research International. Article ID 204237, 13 pages.
- STAIB, F (1965). *Serum-proteins as nitrogen source for yeastlike fungi*. Sabouradia, v. 4, n.3, p. 187-193.
- TAIWO AA, HASSAN Z. (2010). *The impact of Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) on the clinical features of HIV - related oral lesions in Nigeria*. AIDS Research and Therapy, 7:19.
- TAVANTI A, DAVIDSON AD, GOW NAR, MAIDEN MCJ, ODDS FC (2005). *Candida orthopsilosis and Candida metapsilosis spp. nov. to replace Candida parapsilosis groups II and III*. Journal of clinical microbiology, 43(1): 284-292.
- TAYLOR BN, FICHTENBAUM C, SAAVEDRA M, SLAVINSKY J, SWOBODA R *et al.* (2000). *In vivo virulence of Candida albicans isolates causing mucosal infections in people infected with the human immunodeficiency virus*. Jour Infec Dis 182:955-9.
- THEIN ZM, SAMARANAYAKE YH, SAMARANAYAKE LP (2007). *In vitro biofilm formation of Candida albicans and non-albicans Candida species under dynamic and anaerobic conditions*. Arch Oral Biol 52(8):761-7.
- TOBUDIC S *et al.* (2012). *Antifungal susceptibility of Candida albicans in biofilms*. Mycoses. 55: 199-204.
- TROFA D, GÁCSEER A, NOSANCHUK JD (2008). *Candida parapsilosis, an emerging fungal pathogen*. Clinical Microbiology Reviews 21(4):606-625.
- TSANG CSP *et al.* (2007). *Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of Candida albicans isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus*. Journal of Medical Microbiology 56:1393-1398.
- TUMBARELLO M *et al.* (2007). *Biofilm production by Candida species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia*. Journal of Clinical Microbiology junho, p.1843-1850.
- UNAIDS (2011) – UNITED NATIONS PROGRAME ON HIV/AIDS. Global HIV/AIDS Response - *Epidemic update and health sector towards universal access, Progress Report*. p. 19. Acesso em 10 de janeiro de 2014. Disponível em http://www.who.int/hiv/pub/progress_report2011/en/index.html
- UNAIDS (2013) – UNITED NATIONS PROGRAME ON HIV/AIDS. AIDS by the number 2013. Disponível em: www.unaids.org. Acesso em 20 de janeiro de 2014.
- WHITE TC *et al.* (2002). *Resistance mechanisms in Clinical isolates of Candida albicans*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, June, 46(6): 1704–1713.
- WILLIAMS DW, JORDAN RPC, WEI X, ALVES CT, WISE MP, WILSON MJ, LEWIS MAO (2013). *Interactions of Candida albicans with host epithelial surfaces*. Journal of Oral Microbiology 5: 22434.

YANG YL, LO HJ, HUNG CC, LI Y (2006). *Effect of prolonged HAART on oral colonization with Candida and candidiasis*. BMC Infectious Diseases 2006, 6:8.

YAPAR N (2014). *Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis*. Ther Clin Risk Manag 10:95-105.

ANEXOS

Anexo 1A**UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO**

UFRJ

**INSTITUTO DE PUERICULTURA E PEDIATRIA MARTAGÃO GESTEIRA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA****CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

O projeto "Estudo da atividade antifúngica da lactoferrina sobre espécies de *Candida* isoladas da cavidade oral de crianças infectadas pelo HIV", cadastrado com o número 63/11, de responsabilidade da Dra. Thais Pinto Alves, foi analisado pelo CEP/IPPMG e aprovado nesta data.

Solicitamos o envio dos relatórios rotineiros periódicos nos seguintes prazos:

- a) 12 meses após o início efetivo
- b) a cada ano até o termino do projeto.

Rio de Janeiro, 1º de novembro de 2011

A handwritten signature in black ink, which appears to read "Maria do Carmo Soares Alves Cunha".

Maria do Carmo Soares Alves Cunha

Coordenadora do CEP/IPPMG

Anexo 1B



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ESTUDOS DE SAÚDE COLETIVA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER Nº03/2012
PROCESSO Nº67/2011

Projeto de Pesquisa:. Estudo da atividade antifúngica da lactoferrina sobre espécies de candida isoladas da cavidade oral de crianças.


Pesquisador: Thais Pinto Alves

O Comitê de Ética em Pesquisa, tendo em vista o que dispõe a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, resolve APROVAR o presente projeto.

Informamos que o CEP está à disposição do pesquisador para quaisquer esclarecimento ou orientação que se façam necessários no decorrer da pesquisa.

Lembramos que o pesquisador deverá apresentar relatório da pesquisa no prazo de um ano a partir desta data.

Cidade Universitária, 15 de fevereiro de 2012.


Marisa Palácios
Coordenadora CEP/IESC

Anexo 1C



UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO
UFRJ


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

MEMORANDO DE APROVAÇÃO

Com base na resolução 466 de 12 de dezembro de 2012, do CNS/MS, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira da Universidade Federal do Rio de Janeiro, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, aprovou na reunião ordinária realizada na data de hoje o adendo ao projeto “Estudo da atividade antifúngica da lactoferrina sobre espécies de cândida isoladas da cavidade oral de crianças infectadas pelo HIV”, apresentado em 16/05/2013.

Este projeto, cadastrado com o número 63/11, é de responsabilidade da Professora Glória Fernanda Barbosa de Araújo Castro, que fica, desde já, notificada da obrigatoriedade da apresentação de relatórios anuais nos meses de maio dos anos vigentes com o resumo do desenvolvimento da pesquisa até o término da mesma quando, então, deverá enviar o relatório final sucinto com todas as informações relevantes (item XI.2 da Resolução 466).

Rio de Janeiro, 16 de maio de 2013



Maria do Carmo Soares Alves Cunha
Coordenadora do CEP/IPPMG

Anexo 2A



FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ODONTOPEDIATRIA
MESTRADO EM ODONTOPEDIATRIA

Consentimento Livre e Esclarecido

Estudo da Atividade Antifúngica da Lactoferrina Sobre Espécies de *Candida* Isoladas da Cavidade Oral de Crianças Infectadas pelo HIV

Prezado responsável,

A Disciplina de Odontopediatria da UFRJ e o Projeto SIDA/AIDS do IPPMG estão estudando os tipos de micróbios que habitam a boca das crianças infectadas pelo HIV em tratamento no ambulatório da DIP - Imuno do IPPMG. Para isso, será necessário coletar um pouco da saliva da criança, para ser estudada num laboratório como age uma proteína (Lactoferrina) muito importante produzida por nós mesmos na saliva e será feito um exame clínico da cavidade oral. A criança também receberá escovação supervisionada e aplicação de flúor. Caso ela necessite de tratamento odontológico restaurador, ela receberá a(s) obturações necessárias no próprio projeto, e havendo necessidade de extrações ela será encaminhada para a Clínica de Odontopediatria – FO/UFRJ. O estudo está de acordo com o estabelecido na Resolução do CNS 196/96 e suas complementares e com o Código de Ética Médica de 1988. A participação é voluntária e em casos de desistência, a criança não sofrerá prejuízos em relação ao atendimento odontológico. As informações sobre cada criança retiradas de suas fichas médicas são confidenciais e sigilosas, sendo que a identidade de cada participante só será utilizada por membros da equipe da pesquisa.

É importante lembrar que os procedimentos realizados pelos próprios dentistas para coletar a saliva não causarão, de maneira alguma, dano à criança.

O responsável pelo paciente poderá solicitar sua saída do estudo em qualquer momento, assim como a própria criança, e neste caso, os responsáveis pelo projeto se comprometem a não utilizar as informações obtidas. Os resultados desta pesquisa serão divulgados em revistas científicas especializadas e através de painéis e trabalhos científicos, tendo o participante e responsável total acesso aos mesmos, através dos trabalhos ou entrando em contato com a pesquisadora através do telefone abaixo.

Em caso de dúvidas ou necessidades, o responsável poderá entrar em contato com: Dra. Thais Alves, na Faculdade de Odontologia da UFRJ (Departamento de Odontopediatria e Ortodontia), ou pelos telefones (21) 2562-2101 / (21) 2562-2098/ (21) 81897441.

Atenciosamente,

Assinatura do Pesquisador Responsável

Eu, _____ identidade nº _____
_____ responsável pelo menor

_____, concordo com o que foi exposto acima e autorizo sua participação na pesquisa.

Rio de Janeiro, ____ de _____ de _____.

Assinatura do Responsável

Anexo 2B



FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ODONTOPEDIATRIA
MESTRADO EM ODONTOPEDIATRIA

Estudo da Atividade Antifúngica da Lactoferrina Sobre Espécies de *Candida* Isoladas da Cavidade Oral de Crianças

Prezado responsável,

A Disciplina de Odontopediatria da UFRJ está estudando os tipos de micróbios que habitam a boca das crianças em tratamento odontológico. Para isso, será necessário colher um pouco de saliva da criança que deverá cuspir por 1 minuto, apenas uma única vez em um recipiente estéril. A mesma será estudada em um laboratório e um exame clínico da cavidade oral da criança será feito. A criança também receberá escovação supervisionada, ou seja, acompanhada por um dentista que explicará a criança a forma correta de escovar os dentes, posteriormente fará a aplicação de flúor. O responsável pela criança deverá responder algumas questões pessoais sobre a criança, entretanto, tais respostas serão mantidas em sigilo. Caso ela necessite de tratamento odontológico restaurador, ela receberá a(s) obturações necessárias, e havendo necessidade de extrações elas serão realizadas, assim como todos os procedimentos odontológicos necessários cabíveis ao odontopediatra. Estes procedimentos serão realizados de forma gratuita pelo pesquisador e sua equipe. A criança não precisará ir a Universidade apenas para realizar a coleta, a mesma será feita no momento em que a criança estiver procurando atendimento, estiver no processo de triagem ou mesmo sendo atendida em alguma clínica do setor de odontopediatria. O estudo está de acordo com o estabelecido na Resolução do CNS 196/96 e suas complementares e com o Código de Ética Médica de 1988. A participação é voluntária e em casos de desistência, a criança não sofrerá prejuízos em relação ao atendimento odontológico. As informações sobre cada criança retiradas de suas fichas médicas são confidenciais e sigilosas, sendo que a identidade de cada participante só será utilizada por membros da equipe da pesquisa.

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

Em caso de dúvidas ou necessidades, o responsável poderá entrar em contato com: Dra. Thais Alves, na Faculdade de Odontologia da UFRJ (Departamento de Odontopediatria e Ortodontia), ou pelos telefones (21) 2562-2101 / (21) 2562-2098/ (21) 81897441, ou mesmo com o Comitê de Ética em Pesquisa - Instituto de Estudos em Saúde Coletiva localizado na Praça Jorge Machado Moreira, 100 - Cidade Universitária – Telefone: (21) 2598-9293 - www.iesc.ufrj.br – e-mail: cep@iesc.ufrj.br

Atenciosamente,

Assinatura do Pesquisador Responsável

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

Rio de Janeiro, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Responsável