



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



**AÇÃO ANTIFÚNGICA DA LACTOFERRINA FRENTE *Candida non-
albicans* ISOLADAS DA CAVIDADE ORAL DE CRIANÇAS
INFECTADAS PELO HIV**

PAULA MORAES LIMA

Rio de Janeiro
2016



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



**AÇÃO ANTIFÚNGICA DA LACTOFERRINA FRENTE *Candida non-
albicans* ISOLADAS DA CAVIDADE ORAL DE CRIANÇAS
INFECTADAS PELO HIV**

PAULA MORAES LIMA

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/UFRJ/Niterói

Rio de Janeiro
2016

Ficha Catalográfica

Lima, Paula Moraes

Ação antifúngica da lactoferrina frente *Candida non-albicans* isoladas da cavidade oral de crianças infectadas pelo HIV / Paula Moraes Lima. - Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Odontologia, 2016.

61 f. : il. ; 31 cm.

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

Dissertação (mestrado) – UFRJ, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-graduação em Odontologia, Odontopediatria, 2016.

Referências bibliográficas: f. 51-54.

1. Lactoferrina - análise. 2. *Candida* - classificação. 3. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida - métodos. 4. Saliva. 5. Criança. 6. HIV. 7. Odontopediatria - Tese. I. Castro, Glória Fernanda Barbosa de Araújo. II. Portela, Maristela Barbosa. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-graduação em Odontologia, Odontopediatria. IV. Título.



FOLHA DE APROVAÇÃO

LIMA, PAULA MORAES

**“AÇÃO ANTIFÚNGICA DA LACTOFERRINA FRENTE CANDIDA NON-ALBICANS ISOLADAS DA
CAVIDADE ORAL DE CRIANÇAS INFECTADAS PELO HIV”**

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

Rio de Janeiro, ____/____/2016.

Prof. Dra. Andrea Gonçalves Antonio

DO–Prof. Adjunta do Departamento de Odontopediatria e Ortodontia da FO-UFRJ

Prof. Dra. Ivete Pomarico Ribeiro de Souza

DO–Prof. Titular do Departamento de Odontopediatria e Ortodontia da FO-UFRJ

Prof. Dra. Daniela Sales Alviano

DO – Prof. Adjunta do Instituto de Microbiologia / UFRJ

DEDICATÓRIA

A meus pais, com amor, por todo o carinho, pela compreensão nas minhas ausências, por todo conforto nos momentos de tristeza, pela amizade e por tudo que fazem para deixarem minha vida mais doce e leve.

Muito Obrigada por não terem medido esforços para eu chegar até aqui e pelo amor incondicional que vocês me proporcionam.

AMO VOCÊS!!

AGRADECIMENTOS

À **Deus** por estar presente em todos os momentos da minha vida, me iluminando e guiando constantemente, todos os dias.

Ao meu pai, **Paulo**, meu herói. Sua serenidade, ensinamento, enorme carinho, amor, cautela com tudo e para com todos, me tornam a cada dia uma pessoa melhor. Obrigada por tudo que faz por mim, por ter um coração enorme, por fazer com que eu seja sua "*Lilinha*" mesmo já crescida. Sua presença é o maior motivo de felicidade da minha vida. És o maior orgulho que tenho, tudo o que faço é para você. É o maior exemplo de pai e de pessoa para muita gente! Não consigo medir o tamanho do carinho e admiração que tenho por você.

À minha mãe, **Zélia**, melhor amiga. Sua força, garra, vontade, prestatividade, carinho e orações me ajudaram a chegar aonde cheguei! Suas palavras de carinho nos momentos que mais me desesperei, foram fundamentais. Só você sabe o quanto foi importante para mim, sem você não poderia ter chegado até aqui! Exemplo de mãe!

Ao **Ruan**, meu príncipe. Seu amor, carinho, compreensão, incentivo, torcida, admiração e paciência durante todos esses anos vividos juntos foram fundamentais para que esta jornada fosse cumprida! Sua parceria, disposição e amizade foram essenciais!

À minha irmã, **Mariana**, meu exemplo. Sua torcida, seu apoio, paciência, incentivo, carinho e alegria contribuíram muito para essa conquista. Não teria como eu ter escolhido uma irmã mais querida para mim. Muito obrigada!

Ao **Henrique**, meu sobrinho. Mesmo sendo muito pequeno para entender tudo isso, foi capaz de me ajudar nos meus momentos de maior fraqueza. Seu sorriso faz de mim uma pessoa mais feliz!

A todos os meus familiares e amigos, pela paciência e incansável torcida por esta e outras realizações.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Gloria Fernanda Barbosa de Araújo Castro**, pela honra do convívio acadêmico, pela dedicação ao ensino e pela atenção, paciência, disponibilidade e rigor na orientação deste trabalho. Agradeço imensamente por estar comigo desde quando eu era sua aluna de iniciação científica e sempre ter me estimulado a fazer mais. Em todos esses anos, realmente aprendi muito com você. Seu carinho, com toda certeza, foi primordial nessa etapa. Obrigada por nunca ter me deixado escapar. Tenho um enorme orgulho em ser sua orientanda.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Maristela Barbosa Portela**, pela orientação e pela confiança no meu trabalho. Seus conhecimentos me ajudaram a entender uma pequena parte deste enorme mundo laboratorial. Seu apoio foi fundamental. Sua alegria e energia contagiavam todos a sua volta!

A todos os professores do departamento de Odontopediatria que de forma personalizada propiciaram o meu crescimento pessoal e profissional...

Profa. Dra. Andréa Gonçalves Antonio, por todo o carinho, dedicação, profissionalismo, ensinamentos. Tenho muito orgulho de ter sido sua aluna desde a época da minha graduação. Você foi a maior inspiração para eu seguir a Odontopediatria. Obrigada por me ouvir, aconselhar e por confiar tanto no meu trabalho, quando eu tive o privilégio em lhe ajudar na supervisão da Clínica de Bebês.

Profa. Dra. Ivete Pomarico Ribeiro de Souza, pelo exemplo de dedicação, profissionalismo, carinho, acessibilidade e delicadeza. Com a senhora tive a oportunidade de aprender muito e absorver experiências valiosas.

Profa. Dra. Aline de Almeida Neves, por todo ensinamento sobre artigos científicos, e por ter me mostrado uma parte eficiente e prática durante a clínica de Odontopediatria.

Profa. Dra. Laura Salignac de Souza Guimarães Primo, pelo incentivo, disponibilidade e amizade.

Profa. Dra. Lucianne Cople Maia, pelos enormes ensinamentos e experiências transmitidas.

Prof. Marcelo Costa, pelo carinho e incentivo. Seu cuidado e carinho com os alunos são essenciais nesta etapa.

Prof. Rogério Gleiser, pelo incentivo, apoio, confiança, disponibilidade e trocas de experiências e valiosos ensinamentos constantes. Um exemplo de professor e profissional que admiro muito.

Prof. João Farinhas, pela contribuição no meu aprimoramento, me dando sempre cobertura principalmente nas atividades práticas.

Profa. Nena e Marta, pela amizade, alegria e leveza de lidar com as situações mais controversas.

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

Aos amigos conquistados no laboratório, **Alexandre, Daniel e Ariadne**, pelos ensinamentos transmitidos e apoio, tornando o ambiente laboratorial mais alegre e todos os experimentos mais simples.

Aos meus amigos de turma, **Andréa, Fernanda e Káiron**, chegamos até aqui juntos. Muito obrigada pela troca de experiências, momentos inesquecíveis, apoio, companheirismo. Agradeço especialmente à minha querida amiga **Aline**, que fez com que essa jornada se tornasse menos difícil. Muito obrigada por toda cumplicidade, pelos ótimos momentos vividos, por todo carinho, por toda atenção, por todo ensinamento e incentivo nas horas mais difíceis. Obrigada pela amizade. Estes dois anos de amizade ficarão para sempre na memória. Sentirei falta deste convívio diário.

Aos meus amigos veteranos, **Lívia e Marina**, pelo ótimo convívio, em especial **Adrielle, Thiago e Clarissa** por toda amizade, ajuda incansável e primordial para

o aprimoramento deste trabalho. A experiência e ensinamentos de vocês ajudaram muito nesta caminhada! Vocês fizeram muita falta no segundo ano.

Às amigas mais novas, **Daniele, Paula Pires, Roberta** e especialmente à **Raquel**, pela amizade, confiança, apoio e incentivo nesta reta final. Foi muito bom conhecê-las e dividir momentos tão especiais com vocês.

Aos alunos e ex-alunos do doutorado, **Adílís, Michelle Ammari, Andréa Pintor, Tatiana Kelly, Marlus Cajazeira, Michelle Lenzi**, por todo ensinamento, amizade, carinho, companhia e incentivo.

À **Cristiana Aroeira e Thaís Alves**, por terem me dado a oportunidade de aprender com seus trabalhos quando eu era aluna da iniciação científica. Vocês foram muito especiais para mim.

Às Acds, **Andréa, Kátia e Mere**, pela amizade, profissionalismo, disponibilidade, alegria, ensinamentos e maravilhosos momentos vividos juntos.

Às recepcionistas, **Bebel e Rose**, pela ajuda, carinho e calma nos momentos de loucura na recepção. Vocês foram fundamentais.

Ao **João Carlos**, pela contribuição imprescindível nos momentos de maior desespero e para a conclusão desse trabalho.

Aos demais funcionários do Departamento de Odontopediatria da FO/UFRJ **Robson, Zezé, Luíza, Edinaldo**, pelo convívio harmonioso, pela disposição e alegria.

Aos pacientes pelo carinho e paciência durante esses anos de aprendizados e experiências.

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

A todos que participaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

“Aprendi que todas as formas de conhecimento são transitórias e que elas só têm real valor quando utilizadas em benefício dos seres e de tudo o que existe no campo universal. Todavia, de nada vale todo o conhecimento do mundo se não houver AMOR”.

Alcione Leite da Silva

RESUMO

LIMA, PAULA MORAES. **Ação antifúngica da lactoferrina frente *Candida non-albicans* isoladas da cavidade oral de crianças infectadas pelo HIV.** Rio de Janeiro, 2016. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de concentração: Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

A lactoferrina é uma glicoproteína de ligação ao ferro, que está presente na saliva, no leite, e em outras secreções exócrinas. Essa proteína tem inúmeras funções biológicas, incluindo efeitos antifúngicos e antibacterianos, além de imunomoduladores. O objetivo do presente estudo foi avaliar, *in vitro*, pela primeira vez, a atividade antifúngica da lactoferrina contra cepas de *Candida não-albicans* isoladas da cavidade oral de crianças infectadas pelo HIV e crianças saudáveis. Além disso, mensurar a degradação da lactoferrina por essas cepas através de SDS-PAGE (análise eletroforética em gel de poliacrilamida) e determinar, *in vitro*, a concentração mínima inibitória de lactoferrina capaz de matar 50% das células de *Candida não-albicans*. Cepas de *Candida spp.* foram obtidas através da coleta de saliva de 70 crianças infectadas pelo HIV e 50 crianças sem evidências de imunossupressão, com idade de 3 a 13 anos (ALVES, 2014). As diferentes espécies de *Candida* foram identificadas através de assimilação e fermentação de açúcar (API 20C[®], Biomérieux, França). Para o ensaio, *in vitro*, de morte celular na presença de lactoferrina, 24 isolados de *Candida*, entre elas *parapsilosis*, *tropicalis*, *krusei*, *guilliermondii* e *dublinskiensis*, foram selecionados. Para a realização da análise por SDS-PAGE, cepas de todas as espécies consideradas resistentes nos ensaios de morte celular, foram incluídas. O percentual de morte celular (%) de *Candida não-albicans* com a adição de 100 µg/ml de lactoferrina variou de 3,1% (*C. dublinskiensis*) a 88,1% (*C. tropicalis*) no grupo HIV, e de 14,1% a 30,37% no grupo não-HIV (*C. parapsilosis*). Não houve correlação entre a densidade celular e o percentual de morte celular. *C. dublinskiensis* foi a espécie mais resistente a lactoferrina e o percentual de morte celular de *C. parapsilosis* foi significativamente maior em comparação com *C. krusei* na concentração de 1×10^4 células/ml ($p = 0,033$). Todos os isolados foram capazes de degradar a lactoferrina na concentração 1×10^8 células/ml, especialmente *C. parapsilosis*, pelo grupo HIV. Além disso, a lactoferrina na concentração de 500 µg/ml foi capaz de matar mais de 50% das células apenas dos isolados de *C. tropicalis* e *C. guilliermondii*. Concluiu-se que a lactoferrina tem atividade antifúngica contra *Candida não-albicans* de crianças infectadas pelo HIV, mas algumas espécies apresentam alguma resistência a esta proteína. Além disso, todas as *Candida spp.* foram capazes de degradar a lactoferrina quando estavam em concentração de 1×10^8 cels/ml, e a lactoferrina na concentração de 500 µl/ml foi capaz de matar mais que 50% das células de *C. tropicalis* e *C. guilliermondii*.

ESCRITORES: Proteína Salivar Antimicrobiana. Lactoferrina. Crianças Infectadas pelo HIV. Colonização por Fungos. *Candida não-albicans*.

SUMMARY

LIMA, PAULA MORAES. **Ação antifúngica da lactoferrina frente *Candida non-albicans* isoladas da cavidade oral de crianças infectadas pelo HIV.** Rio de Janeiro, 2016. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de concentração: Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Lactoferrin is an iron-binding glycoprotein, which is present in saliva, milk and other exocrine secretions. This protein has a number of biological functions, including antifungal, antimicrobial and immunomodulatory effects. The aim of this study was to evaluate, for the first time, the antifungal activity of lactoferrin against isolates of *Candida* spp. from the oral cavity of HIV-infected children and children with no clinical evidence of immunosuppression. Furthermore, measure, *in vitro*, the degradation of lactoferrin by *Candida* spp. through SDS-PAGE (electrophoretic analysis on polyacrylamide gel) and determine, *in vitro*, the minimum inhibitory concentration of lactoferrin able to kill 50% of cells of *Candida non-albicans*. Strains of *Candida* spp. were obtained through saliva collect of 70 HIV-infected children and 50 children without evidence of immunosuppression ageing between 3 to 13 years old (ALVES, 2014). All *Candida* species were identified by sugar assimilation and fermentation (API 20C®, Biomerieux, France). For the *in vitro* study, death of lactoferrin of 24 *Candida* isolates, including *parapsilosis*, *tropicalis*, *krusei*, *guilliermondii*, and *dublinskiensis*, were selected. To perform the analysis by SDS-PAGE, strains of all available species considered resistant, which were observed at lactoferrin death's study, were included. The cell death percentage (%) of non-*albicans* *Candida* by addition of 100 µg of lactoferrin range from 3.1% (*C. dubliniensis*) to 88.1% (*C. tropicalis*) in HIV group, and 14.1% to 30.37% in N-HIV (*C. parapsilosis*), but there was no correlation between cell density and death %. *C. dubliniensis* was the most resistant specie to lactoferrin and the cell death % of *C. parapsilosis* was significant higher comparing to *C. krusei* at 1×10^4 cells/ml ($p=0.033$). All the isolates were able to degrade lactoferrin at 10^8 cells/ml, mainly *C. parapsilosis* from HIV. Furthermore, lactoferrin at 500 µg/ml concentration was able to kill more than 50% of the cells only for *C. tropicalis* and *C. guilliermondii* isolates. It was concluded that lactoferrin has antifungal activity against non-*albicans* *Candida* from HIV children, but some species present some resistance to this protein. Furthermore, all *Candida* spp. were able to degrade lactoferrin when was at concentration of 1×10^8 cells / ml, also, lactoferrin at concentration 500 µg / ml was able to kill more than 50% of *C. tropicalis* and *C. guilliermondii* cells.

Key Words: Salivary Antimicrobial Protein. Lactoferrin. HIV-Infected Children. Fungal Colonization. Non-*albicans* *Candida*

LISTA DE FIGURAS

- Figure 1: Anti-candidial effect of lactoferrin in *C. parapsilosis* and *C. krusei* was seen through different cells density 45
- Figure 2: A representative image of degradation of lactoferrin by *Candida non-albicans* demonstrating degradation level proportional to cell density (cells/ml)... 45
- Figure 3: Minimum inhibitory concentration of lactoferrin expressed on $\mu\text{g/ml}$ in *Candida* spp. The results of cell death are expressed as percentage..... 46

LISTA DE TABELA

Table 1: Cell killing in percentage by lactoferrin in different species of <i>Candida</i> in HIV and N-HIV groups.....	44
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

- AIDS Acquired Immunodeficiency Syndrome
- BHI Brain Heart Infusion
- CD Cirurgiã-dentista
- CD4 CD4 lymphocytes
- cell/ml Célula por mililitro
- CFU Colony forming unit
- CFU/ml Colony forming unit per milliliter
- g grama
- GHIV Grupo HIV
- h hora
- HAART Highly Active Antiretroviral Therapy
- HAART Terapia Múltipla Combinada com Antiretrovirais e Inibidores de Proteases
- HIV Vírus da Imunodeficiência Humana
- HIV Human Immunodeficiency Vírus
- IESC Instituto de Estudos em Saúde Coletiva
- IPPMG Instituto de Pediatria e Puericultura Margatão Gesteria
- KDa Kilodalton
- LF Lactoferrin
- LF Lactoferrina
- LT CD4 Linfócito T CD4
- ml Mililitro

- ml/min Mililitro por minuto
- n Number
- n Número
- NS Não significativo
- SDS-PAGE Análise eletroforétic em gel de poliacrilamida
- UFC Unidade formadora de colônia
- UFRJ Universidade Federal do Rio de Janeiro
- χ^2 Chi-squared
- Yeast/ml yeast per mililiter

LISTA DE SÍMBOLOS

μl	Microlitro
$\mu\text{l/ml}$	Microlito por mililitro
=	Igual
+	Positivo
-	Negativo
\pm	Mais ou menos
>	Maior que
<	Menor que
\geq	Maior igual que
\leq	Menor igual que
%	Porcentagem
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS.....	25
2.1. OBJETIVO GERAL	25
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3. DELINEAMENTO DA PESQUISA	26
4. DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA.....	30
4.1. Salivary lactoferrin and its antifungal activity against non- <i>albicans Candida</i> in HIV-infected children	30
5. CONCLUSÕES.....	47
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
7. ANEXOS.....	51

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que, no ano de 2014, aproximadamente 734 mil pessoas estavam vivendo com HIV/AIDS no Brasil. Nos últimos 5 anos, o Brasil registrou a média de 39,7 mil casos de AIDS, sendo que a taxa de detecção da doença apresenta média de 20,5 casos a cada 100 mil habitantes. No que se refere à mortalidade em decorrência de AIDS, desde o início da epidemiologia da doença, em 1980, até dezembro do ano de 2013, foram identificados 278.306 óbitos, sendo a maioria na região Sudeste (61,8%) (UNAIDS, 2014).

Segundo a estimativa de prevalência de HIV em parturientes, o número esperado de gestantes com HIV no Brasil é de aproximadamente 12 mil mulheres por ano. Desde 2000 até junho de 2014, foram notificadas 84.558 gestantes infectadas pelo HIV, a maioria residente na região Sudeste (41,1%). Em crianças menores de cinco anos de idade, tem-se observado uma tendência de queda estatisticamente significativa no país como um todo, a qual seria de 35,7% nos últimos 10 anos. Os estados de Amapá e Rio Grande do Sul são os que apresentam as maiores taxas de crianças infectadas pelo HIV, com uma média de 7,2 casos para cada 100 mil habitantes, sendo que a forma principal de transmissão é vertical (UNAIDS, 2014).

Esta diminuição do número de crianças infectadas pelo HIV confirma a eficácia da política de redução da transmissão vertical do vírus, ou seja, da mãe para o bebê. Quando todas as medidas de prevenção da transmissão do vírus são adotadas, a chance de transmissão vertical cai para menos de 1%. (UNAIDS, 2014). Este declínio reflete o aumento da disponibilidade da terapia antirretroviral, bem como apoio e assistência das pessoas que vivem com esta doença. Esta tendência espelha a contínua expansão dos serviços que proporcionam tratamento para as crianças infectadas pelo vírus.

A Síndrome da Imunodeficiência Humana é uma doença infectocontagiosa, que tem como agente etiológico o vírus da Imunodeficiência Humana. Este vírus é considerado um retrovírus cujo material genético está sob a forma de RNA. Ele possui afinidade pelo antígeno de superfície CD4 presente em linfócitos T auxiliar

e macrófagos, causando desordens no sistema imunológico do indivíduo (FALOON *et al.*, 1989; SILVA *et al.*, 2002).

Linfócitos T CD4 são um grupo de linfócitos encontrados de forma contínua no sangue periférico e tecidos linfoides. São considerados fundamentais para o sistema imunológico humano, porém, são amplamente atacados quando existe infecção pelo HIV, e, ocasiona a vulnerabilidade do indivíduo frente a várias doenças. Diante disso, a contagem desses linfócitos é utilizada como marcador de imunossupressão do indivíduo infectado pelo HIV, pois com ela, é possível monitorar o desenvolvimento da doença e também a resposta do paciente frente a terapia antirretroviral. Desta forma, quanto maior for a destruição dos linfócitos T CD4, maior será a carga viral e por consequência, mais debilitado estará o sistema imunológico do hospedeiro (ABUBAKAR *et al.*, 2012).

As manifestações orais podem ser os primeiros indicadores clínicos de infecção por HIV e estão diretamente relacionados com progressão da doença em crianças (PONGSIRIWET *et al.*, 2004). Uma vez que a boca é facilmente acessível, estes sinais orais devem ser usados para ajudar a diagnosticar, prevenir e intervir na progressão de infecção de HIV para a AIDS (RAMOS-GOMEZ, 1999).

O precoce diagnóstico da doença permite a imediata implementação da terapia múltipla (HAART), a qual se mostra efetiva quando é administrada rapidamente. O HAART é composto por três ou quatro drogas antirretrovirais, incluindo inibidores de protease viral, combinadas entre si que atuam em diferentes fases do ciclo de vida do vírus. Este meio de atuação da terapia múltipla revolucionou o prognóstico da doença. Ao diminuir a replicação viral, o sistema imunológico do paciente se estabiliza, já que a contagem de linfócitos T CD4 aumenta (BIRMAN *et al.*, 2003; HAMZA *et al.*, 2008).

Indivíduos imunocomprometidos, em especial os infectados pelo HIV, constituem uma população que é altamente suscetível a uma série de infecções oportunistas (PONGSIRIWET *et al.*, 2004). Dentre estas, encontra-se a candidíase oral, que apesar de ter sua prevalência diminuída após a introdução do tratamento com o HAART, ainda é a manifestação oral mais comum em

crianças imunocomprometidas. Estima-se que cerca de 85% desses pacientes desenvolvem esta infecção debilitante em algum momento durante a progressão da doença (KHAN et al, 2013).

A *Candida albicans* é o agente etiológico mais frequentemente encontrado nestas lesões, porém, outras espécies como *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida stellatoidea*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, e *Candida dubliniensis* também são considerados agentes patogênicos que causam infecções fúngicas (CHAGAS et al., 2009).

Estes microrganismos são classificados como patógenos oportunistas que, em humanos, vivem de forma comensal em inúmeros sítios anatômicos, como a cavidade oral, o trato gastrointestinal, o epitélio brônquico, a mucosa anal e vaginal, entre outros (MUZYKA & EPIFANIO, 2013). Eles são considerados oportunistas, a partir do momento que são capazes de colonizar as superfícies mucocutâneas de indivíduos saudáveis, mantendo-se em equilíbrio com os mecanismos imunológicos do hospedeiro. Apesar disso, continuam aptos a assumir um perfil patogênico frente a qualquer desequilíbrio do sistema imunológico do hospedeiro (NAGLIK, 2003; MUZYKA & EPIFANIO, 2013).

Embora existam mais de 150 espécies de *Candida* na natureza, apenas 15 são consideradas patogênicas ao humano. Ao longo dos últimos 20 anos, uma alteração foi observada nas taxas de espécies de *Candida* isoladas a partir de pacientes com candidíase, ou seja, a incidência de *Candida albicans* diminuiu, enquanto que a de *Candida não-albicans* aumentou. Especificamente, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* mostram aumento em sua incidência. (LASS-FLÖRL,C., 2009, TRICK, W. E., 2002, MALANI, A., 2005).

Embora esta mudança tenha múltiplas causas, a principal delas é o uso do fluconazol como medida de profilaxia antifúngica, que por consequência, seleciona cepas menos sensíveis; além do uso de antibióticos de amplo espectro. Outros fatores de risco que estão associados com o surgimento de espécies de *Candida não-albicans* incluem a duração de uso de cateter venoso central, cirurgia gastrointestinal recente, o aumento da idade, terapia de glicocorticoides,

diabetes e também o uso de drogas intravenosas (SANGUINETTI, 2015; PFALLER, M. A., 2007; TORTORANO, 2006; RODLOFF, 2011).

Em uma recente revisão sistemática que avaliou a distribuição geográfica das espécies de *Candida não-albicans* em amostras de sangue de pacientes internados em várias partes do mundo, mostrou que elas foram predominantes na Ásia, Europa e também na América do Sul (FALAGAS, M.E., 2010). Além de variação geográfica, a frequência de espécies de *Candida*, incluindo *não-albicans* também pode ser afetada pelos agentes antifúngicos recebidos pelos pacientes (GUINEA, J., 2014), como dito anteriormente.

Nenhuma medicação antifúngica produzida até hoje é adequada para todos os pacientes de forma global devido a ocorrência de hipersensibilidade, interações medicamentosas antagonistas, imunossupressão, além do risco de infecção por patógenos resistentes a múltiplos antifúngicos (LEWIS, 2011). Desta forma, torna-se necessária a busca por tratamentos antifúngicos mais eficazes e menos agressivos para o controle adequado dessas infecções.

Por sua vez, a saliva exerce um papel importante na manutenção da saúde oral, e suas múltiplas funções estão diretamente associadas aos seus componentes (PEDERSEN, 2002). Em pacientes infectados pelo HIV, estudos demonstram a presença de alterações em sua composição bem como em sua quantidade (LIN et al., 2003; ALVES et al., 2014). Lin e colaboradores (2003) ao descreverem os efeitos provocados pela infecção do HIV sobre as glândulas salivares observaram uma significativa redução dos componentes da saliva, incluindo proteínas com propriedades antimicrobianas, o que pode justificar a predisposição de pacientes infectados pelo HIV às infecções orais (LIN et al., 2003).

Entre os componentes salivares existentes, a lactoferrina é considerada um fator importante para manter a saúde oral. Esta proteína está presente em vários fluidos do organismo do indivíduo, como a saliva, lágrima, sêmen, suor, colostro, leite e as secreções nasais. Está em maior concentração no leite e no colostro (em torno de 7 mg/ml) (FARNAUD & EVANS, 2003). É essencial ao

sistema imunológico inato, especialmente por proteger a mucosa superficial de infecções microbianas.

A lactoferrina é uma glicoproteína multifuncional (Orsi *et al*, 2004), do grupo das metaloproteínas pertencente a família das transferinas (Fine *et al*, 2002). Possui massa molecular de 80 kDa e um núcleo porfirínico semelhante ao da hemoglobina, realizando através dele o transporte de ferro (Testa, 2002). Ela é produzida por células epiteliais das mucosas em várias espécies de mamíferos, incluindo humanos, vacas, cabras, cavalos, cães e vários roedores (Torres *et al*, 2006).

A lactoferrina está envolvida em várias funções fisiológicas, incluindo: regulação da absorção de ferro no intestino; resposta imune; ação antioxidante; propriedades anticancerígenas e anti-inflamatórias além da proteção contra infecção causada por microrganismos (González-Chávez *et al*, 2009). Tanto a lactoferrina bovina quanto a humana possuem uma homologia estrutural elevada, bem como as mesmas propriedades antimicrobianas (Ward *et al*, 2004; Orsi, 2004).

Os principais mecanismos de ação da lactoferrina são: (1) propriedade de quelar o íon ferro, privando, assim, os microrganismos dos seus elementos essenciais (Singh *et al*, 2004; Van Nieuw *et al*, 2004; Barker & Barker, 2004; Mazurier & Skik., 1980), (2) causar alterações estruturais induzidas nas paredes celulares das leveduras (Nikawa *et al*, 1993), (3) ativação dos sistemas enzimáticos intracelulares autolíticos consequentes à adsorção da lactoferrina (Laible and Germaine, 1985), (4) provocar aumento no número de células natural Killer (NK) e células T no sangue periférico (Kuhara *et al*, 2000), aumentando a atividade fagocítica dos neutrófilos (Sato *et al*, 1996), e (5) causar morte celular por apoptose (Andrés *et al*, 2008).

Em um estudo conduzido por Alves e colaboradores (2014), no qual saliva de crianças saudáveis e saliva de crianças infectadas pelo HIV foram avaliadas, foi observado que a lactoferrina salivar estava presente em ambos os grupos, porém, crianças infectas pelo HIV apresentavam uma concentração de

lactoferrina salivar estatisticamente maior comparada ao grupo controle; 6.13µg/ml no grupo HIV e 5,74µg/ml no grupo controle (ALVES et al., 2014).

O uso extensivo de antifúngicos na terapêutica e profilaxia da candidíase em pacientes imunocomprometidos contribuiu significativamente para o aumento da resistência de *Candida* spp., principalmente as espécies não-*albicans*, às drogas comumente utilizadas. Diante deste contexto, o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas torna-se muito importante. Atualmente, a literatura demonstra de forma cada vez mais aprofundada, as propriedades antifúngicas da lactoferrina salivar, como mostrou Alves e colaboradores (2014) sobre *Candida albicans*.

Por isso, estudos das propriedades antifúngicas da lactoferrina sob espécies de *Candida* não-*albicans* são de extrema valia, já que cepas destas espécies se mostraram resistentes a antifúngicos já existentes além delas estarem em constante crescimento e em maior presença em indivíduos imunocomprometidos, especificamente os infectados pelo HIV. Espera-se que os resultados encontrados na nossa pesquisa possam ajudar futuramente na elaboração de adequadas ações, com o uso da lactoferrina, para prevenção de infecções oportunistas por espécies de *Candida* não-*albicans* decorrentes da infecção pelo HIV em crianças, como por exemplo, uso de enxaguantes bucais ou géis com concentrações eficientes da lactoferrina para a inibição de candidíase oral, assim como, uma apropriada abordagem terapêutica destes pacientes.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antifúngica da lactoferrina em isolados de *Candida* não-*albicans* oriundas da cavidade oral de crianças infectadas pelo HIV e de crianças sem evidências clínicas de imunossupressão, bem como determinar a concentração mínima de lactoferrina que inibiria o processo inicial de candidíase oral.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar, *in vitro*, a atividade antifúngica da lactoferrina sobre *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida dubliniensis*, *Candida krusei* e *Candida guilliermondii* provenientes da saliva de crianças infectadas pelo HIV .
- Determinar, *in vitro*, a concentração mínima inibitória de lactoferrina capaz de causar 50% de morte celular de *Candida* não-*albicans*.
- Avaliar, *in vitro*, a capacidade de degradação de lactoferrina por *Candida* não-*albicans* através de SDS-PAGE.

3. DELINEAMENTO DA PESQUISA

O presente estudo foi caracterizado como uma pesquisa do tipo transversal, laboratorial, controlado, de caráter descritivo e analítico sobre a ação antifúngica de lactoferrina sobre *Candida não-albicans* isoladas da saliva de crianças infectadas pelo HIV (Grupo HIV), comparando com isolados de crianças clinicamente saudáveis (Grupo NHIV), bem como outros dados propostos pelo estudo.

Este estudo foi conduzido com os isolados clínicos previamente obtidos por Alves e colaboradores (ALVES, 2014). 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, 1B e 1C, págs. 54, 55, 56).

Estudo Prévio (Alves et al, 2014)

Para todas as crianças que participaram do estudo foi obtido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado pelo responsável legal dos pacientes e anuência da criança (Anexos 2A e 2B, págs. 57, 58, 59, 60).

A saliva total estimulada foi coletada de 70 crianças com diagnóstico definitivo para a infecção pelo HIV (pacientes do ambulatório de AIDS Pediátrica do IPPMG), com idade entre 3 a 13 anos; e 50 crianças clinicamente saudáveis com idade entre 3 a 13 anos (pacientes da clínica de Odontopediatria FO, UFRJ), seguida de exame oral; tais procedimentos foram realizados durante o primeiro semestre de 2012 por um único profissional calibrado ($Kappa=0,93$). Crianças cujos valores de saliva estimulada fossem iguais ou inferiores a 0,5 ml/min ou crianças 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 participavam do estudo.

Ainda, 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.

Para a coleta da saliva, a criança era instruída a mascar um tablete de parafilme com tamanho e peso padronizado por 1 minuto e dispensar essa saliva inicial num recipiente plástico descartável. Em seguida, a criança continuava mascando e dispensando a saliva em recipientes plásticos estéreis e descartáveis e, devidamente identificados, por mais 5 minutos. As crianças não podiam ter ingerido alimentos, pelo menos 1 hora antes da coleta. Todas as amostras foram coletadas no período da tarde para maior padronização do estudo. As amostras ficavam devidamente identificadas e mantidas sobre refrigeração por no máximo 2 horas até serem transportadas 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.

Após a coleta, os pacientes receberam escovação supervisionada, além de aplicação tópica de flúor. Todos os pacientes que precisavam de atendimento odontológico foram encaminhados para a clínica de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da UFRJ para tratamento.

A identificação das espécies de *Candida* foi feita de forma presuntiva através da coloração das colônias reveladas no meio de cultura CHROMagar Candida®, de acordo com as instruções do fabricante e as de Odds and 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[®] (Biomerieux, Marcy L'Etoile, France).

Ação antifúngica da Lactoferrina sobre *Candida não albicans*

Para este estudo foram utilizados todos os isolados de *Candida não albicans* obtidos por Alves et al (2014), sendo estes: 10 isolados de *C. parapsilosis* do Grupo HIV e 4 isolados de *C. parapsilosis* do grupo Controle; além de 7 isolados de *C. Krusei*, 1 isolado de *C. dubliniensis*, 1 isolado de *C. guilliermondii* e 1 isolado de *Candida tropicalis*, estes últimos do grupo HIV.. Estes isolados foram cultivadas em meio BHI líquido (Brain heart infusion) (Difco) à 37°C por 24 horas em incubadora com agitador. O crescimento celular foi estimado pela contagem das leveduras em Câmara de Neubauer.

Para avaliação do percentual de morte celular, suspensões padronizadas dos isolados com 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 leveduras/ml foram incubadas sem (grupo controle) e com 100 µg/ml de lactoferrina (Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, MO) por 3 horas a 37°C. A ação antifúngica foi avaliada através do plaqueamento das suspensões em meio de cultura Sabouraud agar e posterior contagem (48 horas) das unidades formadoras de colônias e cálculo do percentual de morte celular na presença da lactoferrina.

Para a análise através de SDS-PAGE, os isolados considerados resistentes à lactoferrina, foram utilizados. Suspensões padronizadas dos isolados com 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 leveduras/ml, após crescimento em meio BHI líquido (Brain heart infusion) (Difco) por 24 horas à 37°C, foram incubadas com 100 µg/ml de Lactoferrina (Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, MO) por 3 horas a 37°C. Essas suspensões foram centrifugadas e os sobrenadantes coletados e filtrados em membrana de 0,22 µm para posterior congelamento e liofilização. Após, as amostras liofilizadas foram ressuspensas em 15 µl de tampão de amostra e então aquecidas à 100°C por 5 minutos, centrifugadas e depois aplicadas no gel de bis-acrilamida. Os géis foram submetidos a uma corrida eletroforética e ao final foram corados com Azul de Comassie.

Para a obtenção da concentração mínima inibitória, os isolados considerados resistentes à lactoferrina no experimento de morte celular foram usados. Para isso, suspensões padronizadas desses isolados na concentração 10^6 leveduras/ml foram incubadas com concentrações crescentes de lactoferrina (150, 200, 250 e 500 $\mu\text{g/ml}$) por 3 horas a 37°C . Um grupo controle também foi feito, sendo que nele, havia concentração de lactoferrina equivalente a zero. A concentração mínima inibitória foi avaliada através do plaqueamento das suspensões em meio de cultura Sabouraud agar e posterior contagem (48 horas) das unidades formadoras de colônias.

Os dados foram analisados pelo programa Epi Info versão 6.0 e pelo programa IBM SPSS Statistics versão 20. Após avaliação dos dados quanto a sua normalidade, testes não-paramétricos foram utilizados para comparar os valores de percentual de morte celular intra e interespécie e o valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Dados relativos a degradação de lactoferrina e MIC foram analisados descritivamente.

O coeficiente de correlação de Spearman foi calculado para verificar a correlação entre o percentual de morte de *Candida* spp. e densidade celular.

O artigo apresentado descreve os resultados sobre um estudo *in vitro*, no qual os isolados de *Candida não-albicans* de crianças infectadas pelo HIV e saudáveis foram comparados quanto a sua susceptibilidade à ação antifúngica da lactoferrina. Além disso, avaliou a capacidade de degradação de lactoferrina por *Candida não-albicans* através de SDS-PAGE. Por fim, ainda se determinou a concentração mínima inibitória de lactoferrina capaz de causar 50% de morte celular de *Candida não-albicans*.

4. DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA

4.1. Salivary lactoferrin and its antifungal activity against *non-albicans Candida* in HIV-infected children

Paula Moraes Lima^a

Thaís Pinto Alves^a

Ariadne Nunes^b

Rosângela Maria de Araújo Soares^b

Maristela Barbosa Portela^c

Gloria Fernanda Barbosa de Araujo Castro^a

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

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

C. Department of Clinics and Pediatrics Dentistry, Universidade Federal Fluminense/Niterói, Rio de Janeiro, Brazil

ABSTRACT

This study aimed to evaluate, *in vitro*, the antifungal activity of lactoferrin against saliva strains of non-*albicans Candida* from oral cavity of HIV-infected (HIV) children and healthy children (N-HIV). Also, measure the lactoferrin degradation by these *Candida* through SDS-PAGE; and determine, *in vitro*, the minimum inhibitory concentration (MIC) of lactoferrin able to cause 50% cell death of non-*albicans Candida*. The antifungal activity of lactoferrin of 20 non-*albicans Candida* isolates from HIV group (10 *C. parapsilosis*; 7 *C. krusei*; 1 *C. dubliniensis*; 1 *C. guilliermondii*; 1 *C. tropicalis*) and 4 isolates from healthy group (4 *C. parapsilosis*) was analyzed. Several cell density of *Candida* spp (10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 yeasts/mL) were incubated with 100 µg/ml of lactoferrin for 3 hours, at 37°C, and then were plated in specific culture medium for *Candida*. After 48 hours, colony-forming units (CFU) were counted and the cell death percentage was calculated. To measure the lactoferrin degradation by these fungi, the two most resistant strains from *C. parapsilosis* (HIV and N-HIV) and *C. krusei* were selected. For the others species, the single isolate was used. Supernatants from each reaction of suspensions were collected and analyzed by SDS-PAGE. To obtain the MIC, one isolated from each specie were incubated with increasing concentrations of lactoferrin (150, 200, 250, 500 µg/ml) for 3h/ 37°C and the CFU were counted after 48 hours. The cell death percentage (%) of non-*albicans Candida* by 100 µg of lactoferrin range from 3.1% (*C. dubliniensis*) to 88.1% (*C. tropicalis*) in HIV group, and 14.1% to 30.37% in N-HIV (*C. parapsilosis*), but there was no correlation between cell density and death %. *C. dubliniensis* was the most resistant specie to lactoferrin and the cell death % of *C. parapsilosis* was significant higher comparing to *C. krusei* at 10^4 concentration ($p=0.033$). All the isolates were able to degrade lactoferrin at 10^8 cells/ml, mainly *C. parapsilosis* from HIV. Furthermore, lactoferrin at 500 µg/ml concentration was able to kill more than 50% of the cells only for *C. tropicalis* and *C. guilliermondii* isolates. Lactoferrin has antifungal activity against non-*albicans Candida* from HIV children, but some species present some resistance to this protein.

Key words: Salivary Antimicrobial Protein, Lactoferrin, Children, HIV-infected children, Saliva, non-*albicans Candida*

INTRODUCTION

The number of *Candida* infection cases has increased in recent years¹. The rate of incidence of *Candida* infection in Brazil is 2.9 cases per 1.000 patients, whereas in United States is 0.28 cases and in Europe 0.20 per 1.000 patients, respectively. That average shows that in Latin America, specifically in Brazil, there is an attendance of 2 to 15 times higher than in the northern hemisphere².

Specifically in children infected with HIV virus, candidiasis is very common, since the patient's immune system is compromised^{3,35}, and the prevalence rates of *Candida* colonization is 80%⁴. *Candida albicans* is the most common cause of invasive disease in most clinical situations, accounting for 50% to 70% of cases, but this rate of this specie is decreasing⁵; therefore, the epidemiology of *Candida* infection has changed in recent years^{24,25}. Longitudinal studies show that a considerable proportion of patients are now infected with non-*albicans Candida* species⁶⁻⁸.

With the increase of *Candida* strains` resistance through established antifungals⁹, it becomes necessary to search for more effective and less aggressive antifungal treatments. Lactoferrin is an iron-binding glycoprotein found in external secretions, such as saliva, milk, and tears¹⁰ and it is known of its ability to inhibit the growth of *Candida albicans* in vitro¹¹. So, considering the prevalence of non-*albicans Candida* species in HIV infected children, the aim of this study was to evaluate the antifungal activity of lactoferrin on these species isolates from oral cavity of HIV pediatric patients, and determine the minimum inhibitory concentration capable of causing 50% death off cells from these strains.

Material and Methods

Subjects

This research was characterized as a cross-sectional, laboratory, controlled, descriptive and analytical study. For this study, we used 24 isolates of non-*albicans Candida* from HIV infected children and healthy children, previously isolated and identified by Alves et al (2014)¹⁵.

Previous study (Alves et al, 2014)

This study had the approval of the Ethics Committee of the Instituto de Estudos de Saúde Bucal, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil (number 03/2012; process 67/2011) and informed consent was obtained from each of the children legal guardians.

In brief, the study group consisted of 70 infected children with confirmed diagnosis (HIV group) attending the Pediatric AIDS Outpatients Clinic at Universidade Federal do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brazil) and 50 healthy children (control group), ageing 3 to 13 years old, selected by convenience. All of them followed up at the Pediatric Dentistry Department of the same institution. The child could not be under antifungal therapy nor have taken any topical antimicrobial medication within 3 months before the collect of the material.

Saliva samples were collected after chewing a paraffin stick (1g) for stimulation and then stored in sterilized disposable plastic tubes. All children should not have eaten one hour before collection, which was always made in the same period, at 13 hours. Samples were taken to the laboratory immediately after collection under refrigeration. All children who had the salivary flow less than 0.5 ml/min were excluded from the study. The salivary collection was performed by a single trained pediatric dentist, after being calibrated by an experienced specialist ($\kappa= 0.93$).

For the microbiologic analysis, saliva was diluted at a ratio of 1:10 with 0.9% sterile saline solution (pH 7.2) without bacteriostatic agents. To quantify and identify the specimens, aliquots of 100 μ l were seeded onto plates with chromogenic agar (CHROMagar Candida; PROBAC, São Paulo, Brazil) and incubated at 37°C for 48-72 hours for presumptive identification of species. Green colonies were inoculated in Sabourraud's dextrose agar to screen their ability to grow at 45°C, for 48 hours, to promote the differentiation between *C. albicans* and *C. dubliniensis*, since the last one can't grow at this temperature. Colonies with different colors were analyzed with the use of biochemical tests for sugar assimilation and fermentation according to the API Candida 20C system

(bioMérieux, Marcy L'Etoile, France), thus allowing the *Candida* species to be positively identified

Lactoferrin and Non-albicans Candida All strains of non-albicans candida identified by Alves et al (2014) were used for this study. This comprised 20 strains from HIV group: 10 of *C. parapsilosis*, 7 of *C. Krusei*, 1 of *C. dubliniensis*, 1 of *C. guilliermondii* and 1 of *C. tropicalis*; and 4 strain of *C. parapsilosis* from healthy children.

Lactoferrin killing assays

Candida cells at various densities (10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 and 10^8 yeasts/ml) were mixed with 100 µg/ml of lactoferrin (Sigma- Aldrich Chemical, St. Louis, MO) in microtubes and incubated for 3 h at 37°C. Negative controls with cells and saline solution (0.85% NaCl) were included. Aliquots from all these reactions were seeded onto Sabouraud agar plates, in duplicate. The number of colonies on each plate was counted after incubated for 48 h at 37°C and the antifungal effect was evaluated by calculating the cell death percentage (%).

SDS-PAGE analysis

For the SDS-PAGE analysis, only isolated of each specie considered resistant to lactoferrin was included in this experiment. Cells at various cell densities (10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 and 10^8 yeasts/ml) after growth in liquid media BHI (Brain Heart Infusion) (Difco), were mixed with 100 µg/ml of lactoferrin (Sigma- Aldrich Chemical, St. Louis, MO) in microtubes and incubated for 3 h at 37°C. These suspensions were centrifuged and the supernatants collected and filtered by a 0.22 µm membrane, than they were frozen and lyophilized. After this, the lyophilized samples were resuspended in 15 µl sample buffer and then heated at 100 °C for 5 minutes and analyzed by bis-acrylamide´s gel (SDS_PAGE). The gels were subjected to electrophoretic run and were stained with Coomassie Blue at the end.

Minimum Inhibitory Concentration

To obtain the minimum inhibitory concentration, isolates considered resistant to lactoferrin at lactoferrin killing assays experiment were used. Cells at the density of 10^6 yeast/ml were incubated with increasing concentrations of lactoferrin (150, 200, 250 and 500 $\mu\text{g} / \text{ml}$) for 3 hours at 37 °C. A control group was used without lactoferrin. The minimum inhibitory concentration (MIC) was assessed by incubating the suspensions onto Sabouraud agar plates and subsequent count of CFU, 48 hours later.

Statistical analysis

Data was analyzed by the IBM SPSS Statistics program version 20. The Shapiro–Wilk normality test was applied in order to verify the normal distribution of the data. Non-parametric tests were used to compare the mean cell death percentage inter and intra specie. The p value of <0.05 was considered as statistically significant. Results of lactoferrin degradation and MIC were descriptively described.

Results

Lactoferrin killing assays

The results of the killing assays revealed that cell death occurred for all non-*albicans* species in HIV group. The *C. dubliniensis* isolates showed the lowest values in all concentrations ranging from 3.1% to 22.1%; the highest values were from *C. tropicalis*, varying from 18.4% to 88.1%. At control group, this number ranged from 14.1% to 30.37% for *C. parapsilosis* (Table 1). No significant differences were observed between the increase of cell concentration and death % intra specie. Besides that, comparisons inter species showed that cell death % of *C. parapsilosis* was significant higher comparing to *C. krusei* at 10^4 cell's density ($p=0.033$) (Table 1, Figs 1).

SDS-PAGE

In vitro degradation assays were designed to determine whether the *C. non-albicans* possess the ability to degrade lactoferrin. Following exposure of the

lactoferrin to *C. non-albicans* whole cells, degradation reactions were subjected to electrophoretic analysis. Results revealed a gradual loss of lactoferrin integrity proportional at all isolates at 10^8 cells/ml mainly *C.parapsilosis* strain from HIV group. In order to illustrate the anti-Candida effect of lactoferrin, Figure 3 shows images of SDS-PAGE.

Minimum Inhibitory Concentration

The results obtained from the minimal inhibitory concentration experiment are shown in Figure 2. Isolates from *C. tropicalis* and *C. guilliermondii* were the only two species in which lactoferrin at maximum concentration (500µg/ml) was able to kill at least 50% of the total cells at concentration of 10^6 cells/ml.

Discussion

It is already known that to develop a microbial infection, it is necessary that a microorganism be virulence and have an environment for microbial colonization. This situation is evident in the oral cavity, since it is an environment that constantly presents microbial challenges. *Candida* spp. is the most successful opportunistic pathogen and its prevalence is high in HIV infected children^{21,22}. To be succeeding, this fungus must have an imbalance in the host, and thus, it will not keep more like commensal microorganism¹¹.

Salivary anti-microbial proteins are considered to be an important part of the non-immune host defence system in preventing colonization and infection of the oral cavity by oral microorganisms. These protective effects of saliva are evidenced by the microbial overgrowth found in patients with salivary deficiencies¹². Earlier studies have already shown that intrinsic components of the host defence system such as histatins, cystatins, immunoglobulins and several saliva proteins, like lysozyme and lactoferrin are capable of killing various *Candida* species^{13,14,15}. The focus of our study was in lactoferrin and it has already been observed that it has antifungal activity against *Candida albicans* from oral cavity of pediatric HIV patients, in vitro¹⁵. Studies of this nature with non-albicans species are scarce in the literature, and to the best of our knowledge, our *in vitro*

study, is the first that determines the ability of lactoferrin to inhibit the growth of *Candida non-albicans* isolated from the saliva of children infected with HIV.

Lactoferrin is an iron-binding glycoprotein, which is present in milk, saliva, and other exocrine secretions as well as in neutrophil granules. This protein has a number of biological functions, including antimicrobial and immunomodulatory effects *in vitro* and *in vivo*²⁶. This glycoprotein is stored in neutrophil secondary granules²⁷ and its main biological function is the sequestration of iron, which is required for bacterial growth^{28,29}. In fungi, it is known that lactoferrin is capable to induce in *Candida* spp. the apoptosis-like cell death³⁵. It is also considered an important nonspecific host defense component for protection against various pathogens³⁰. A potent, *in vitro*, lactoferrin antiviral activity study against HIV has been reported³¹.

It is known that the incidence of *Candida albicans* decreased, whereas the non-*albicans Candida* increased. Although this change has multiple causes, the main one is the use of fluconazole as a measure of antifungal prophylaxis, which, therefore, selects less susceptible strains; and the use of broad-spectrum antibiotics¹⁸. In our study, we had shown that lactoferrin was able to kill cells of non-*albicans Candida* even at concentrations of 1×10^8 cells/ml. According to the literature, lactoferrin has an antifungal capacity but there is no consensus with regard to its inhibitory potency in terms of cell density and lactoferrin concentration against *Candida* species^{15,16,17}.

The results obtained in our study showed similar behavior for *C. parapsilosis* of both groups, but not in the lowest concentration (10^4), suggesting that these species, isolates from HIV infected children were not more resistant than those from immunocompetent patients. In a study conducted by Cannon and Chaffin, it was observed that *C. albicans* cells at a concentration greater than 1×10^2 is considered a sign of illness³². In our study, we used in all experiments concentrations of cells of 1×10^4 or greater. Important to note that our HIV patients were under antiretroviral therapy and the great majority had no immunosuppression according to CD4 cell count.

Comparing our results with those obtained by Alves et al, 2014, we observed that our strains of *C. parapsilosis* and *C. krusei* showed less values of cell death percentage. It could indicate that non-*albicans* *Candida* species can be more resistant than the strains of *C. albicans* used by these authors. Among the species we study, our strains of *C. krusei* can be more resistant than the isolates of *C. parapsilosis* in HIV group as the death cell percentage was significant lower for the first one. As was seen in the study of Forastiero et al, 2015, when the authors came to the conclusion that *C. krusei* rapidly becomes resistant to certain antifungal drugs³³.

An also interesting finding in our study was observed that the strain of *Candida dubliniensis* from the HIV group showed the lowest values of cell death % by lactoferrin. Although we used only one strain of this specie, this result suggests that *Candida dubliniensis* could be considered resistant to lactoferrin. This result corroborates with Theill et al, 2015, where the authors reported that strains of *C. dubliniensis* isolated of vulvovaginal region of patients in Argentina, were resistant to many antifungal drugs, such as fluconazole, clotrimazole, itraconazole, voriconazole, nystatin and amphotericin B²⁴.

Meiller et al¹⁹ reported the antifungal capacity of salivary proteins when they studied the antifungal activity of the Histatin-5; however it is known that this potential is not related to one single phenomenon²⁰. By SDS-PAGE, we found that all species was able to degrade lactoferrin at a concentration of 1×10^8 cells/ml. Specifically, the strain of *C. parapsilosis* from the HIV group was the one that degraded more lactoferrin in the same cell density. Generally, this could be explained by the ability of *Candida* spp. to secrete aspartic proteases, which are proteolytic enzymes considered to be an important virulence determinant, since they have a high potential to degrade numerous proteins of the host, including lactoferrin. The presence of this protease in *Candida* spp. provides this fungus an efficient and flexible proteolytic system that may prove vital to its success as an opportunistic pathogen³⁴. We also observed at the minimum inhibitory concentration experiment that *C. tropicalis* and *C. guilliermondii* of HIV group were sensitive to lactoferrin. This result can also be noted through our images taken by SDS-PAGE, in which we found that lactoferrin was degraded to a lesser extent by

these species. It was found that more than 50% of total cells from these species died when exposed to 500 µg/ml of lactoferrin.

A limitation of our study was that we did not have a larger amount of non-*albicans Candida* species, specifically *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* and *C. dubliniensis*, which may limit our results in relation to these specific strains. Anyway, we used all strains found in the sample and furthermore, these strains are not much frequent to be found in our population²⁵.

In our laboratory, new studies about lactoferrin and its antifungal activity against *Candida* spp are underway. Determining the precise concentration of lactoferrin capable of inhibiting the growth of *Candida* spp, and therefore inhibit the processes of oral candidiasis, it can help to design new effective and less harmful therapeutic strategies to prevent or treat oral candidiasis. In addition, lactoferrin is an endogenous protein, so it's may be non-toxicity and can contribute to become a new therapeutic agent in the future for the diseases mentioned above.

In conclusion, our study showed that lactoferrin has an antifungal capacity in non-*albicans Candida* species from HIV and healthy children, and all non-*albicans Candida* species were capable to degrade lactoferrin at concentration of 1×10^8 cells/ml. These results can help us in prevention and control of these fungi in immunocompromised patients.

Acknowledgement

The authors would like to thank CAPES and FAPERJ (Brazil) for the financial support.

References

- 1- Arendrup MC (2010). Epidemiology of invasive candidiasis. *Curr Opin Crit Care*; 16: 445–52.
- 2- Colombo AL (2006). Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers . *Journal of clinical microbiology*. p. 2816–2823.

- 3- Khan RM (2013). Non-Injection and injection drug use and STI/HIV risk in the United States: The Degree to which Sexual Risk Behaviors Versus Sex with and STI-infected partner account for infection transmission among drug users. *AIDS and Behaviour*. 17: 1185-1194.
- 4- Cerqueira DF (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.
- 5- Arendrup MC (2010). Epidemiology of invasive candidiasis. *Curr Opin Crit Care*; 16: 445–52.
- 6- Diekema DJ, Messer SA, Brueggemann AB (2002). Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. *J Clin Microbiol*; 40: 1298 –302.
- 7- Samonis G, Kofteridis DP, Saloustros E (2008). *Candida albicans* versus non-*albicans* bloodstream infection in patients in a tertiary hospital: an analysis of microbiological data. *Scand J Infect Dis*; 40: 414–9.
- 8- Pfaller MA, Messer SA, Moet GJ, Jones RN, Castanheira M (2011). *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in intensive care unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008–2009). *Int J Antimicrob Agents*; 38: 65–69.
- 9- Sanguinetti M, Posteraro B, Lass-Flörl C (2015). Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses*; 58 (Suppl. 2), 2–13.
- 10- Weinberg ED (2001). Human lactoferrin: a novel therapeutic with broad spectrum potential. *J Pharm Pharmacol*; 53: 1303–10.
- 11- Peters BM, Zhu J, Fidel Jr PL, Scheper MA, Hackett W, Shaye SE, Jabra-Rizk MA (2010). Protection of the oral mucosa by salivary histatin-5 against *Candida albicans* in an *ex vivo* murine model of oral infection. *FEMS Yeast Res* . 2010 August 1; 10(5): 597–604
- 12- Back-Britto GN, Mota AJ, Vasconcellos TC, Querido SMR, Jorge AOC, Reis ASM, Balducci I, Koga-Ito CY (2009). Frequency of *Candida* spp. in

- the oral cavity of Brazilian HIV-positive patients and correlation with CD4 cell counts and viral load. *Mycopathologia*; 167:81–7.
- 13- Van Nieuw Amerongen A, Bolscher JG, Veerman EC (2004). Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology? *Caries Res*; 38(3):247–53. 17.
 - 14-Jenssen H, Hancock RE (2009). Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochimie*; 91:19–29.
 - 15- Alves TP, Simões ACDC, Soares RMA, Moreno DAS, Portela MB, Castro GFBA (2014). Salivary lactoferrin in HIV-infected children: Correlation with *Candida albicans* carriage, oral manifestation, HIV infection and its antifungal activity. *Arch of Oral Biology*; 59:775–782.
 - 16-Rudney JD, Kajander KC, Smith QT (1985). Correlations between human salivary levels of lysozyme, lactoferrin, salivary peroxidase and secretory immunoglobulin A with different stimulatory states and over time. *Arch Oral Biol*; 30:765–71.
 - 17-Van Der Strate BWA, Harmsen MC, The TH, Sprenger HG, De Vries H, Eikelboom MC, Kuipers ME, Meijer DKF, Swart PJ (1999). Plasma lactoferrin levels are decreased in end-stage AIDS patients. *Viral Immunol*; 12:197–203.
 - 18-Sanguinetti M, Posteraro B, Lass-Flörl C (2015). Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses*; 58 (Suppl. 2), 2–13.
 - 19-Meiller TF, Hube B, Schild L, Shirliff ME, Scheper MA, Winkler R, Ton A, Jabra-Rizk MA (2009). A novel immune evasion strategy of *Candida albicans*: proteolytic cleavage of a salivary antimicrobial peptide. *PLoS One*; 4(4):e50339
 - 20-Naglik JR, Albrecht A, Bader O, Hube B (2004). *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol*; 6(10):915–26
 - 21-Portela MB, Souza IPR, EMMB C, Hagler AN, Soares RM, Santos AL (2004). Differential recovery of *Candida* species from subgingival sites in human immunodeficiency virus-positive and healthy children from Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol*; 42:5925-7

- 22-Cerqueira DF, Portela MB, Pomarico L, de Araújo Soares RM, de Souza IP, 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*; 39:188-94.
- 23-Silva DBS, Rodrigues LMC, Almeida AA, Oliveira KMP, Grisolia AB (2016). Novel point mutations in the ERG11 gene in clinical isolates of azole resistant *Candida* species. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; Vol111(3): 192-199.
- 24-Theill L, Dudiuka C, Morano S, Gamarr S, Nardinb ME, Méndez E, Garcia-Eddrona G (2016). Prevalence and antifungal susceptibility of *Candida albicans* and its related species *Candida dubliniensis* and *Candida africana* isolated from vulvovaginal samples in a hospital of Argentina. *Rev Argent Microbiol*; RAM-72; No. of Pages 7.
- 25-Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Noue´r SA, Arthington-Skaggs B, Matta DA, Warnock D, Morgn J (2006). Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. *Journal of Clin Microbiol*; p. 2816-2823.
- 26- Vorland, L (1999). Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein. *APMIS* 107:971-981.
- 27-Falloon J, Gallin JI (1986). Neutrophil granules in health and disease. *J Allergy Clin Immunol*; 77: 653–62.
- 28-Arnold RR, Cole MF, Mcghee JR (1977). A bactericidal effect for human lactoferrin. *Science*; 197: 263–5.
- 29-Arnold RR, Brewer M, Gauthier JJ (1980). Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms. *Infect Immun*; 28: 893–8.
- 30-Kruzel ML, Actor JK, Boldogh I, Zimeck M (2007). Lactoferrin in health and disease. *Postepy Hig Med Dosw*; 61: 261–7.
- 31-Berkhout B, Van Wanel JL, Beljaars L, Meijer DK, Visser S, Floris R (2002). Characterization of the anti-HIV effects of native lactoferrin and milk proteins and protein-derived peptides. *Antiviral Res* 55: 341–55.
- 32-Cannonl RD, Chaffin WL (1999). Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit Rev Oral Biol Med*; 10(33)-359-383.

- 33-Forastiero A, Garcia V, Riviero-Mendez O, Garcia-Rubio R, Monteiro MC, Alastruey-Izquierdo A, Jordan R, Agorio I, Mellado E (2015). Rapid development of *Candida krusei* echinocandin resistance during caspofungin therapy. *Antimicrob Agents Chemother*; 59(11):6975-82.
- 34-Hube B, Naglik J (2001). *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene Family. *Microbiology*, 147, 1997–2005.
- 35-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 Path Med*, 38: 613-622.

Table 1: Cell killing in percentage by lactoferrin in different species of *Candida* in HIV and N-HIV groups.

	HIV				NHIV	
	<i>C.parapsilosis</i> n=10	<i>C.krusei</i> n=7	<i>C.dublinsiensis</i> n=1	<i>C.guilermolerm.</i> n= 1	<i>C. tropicalis</i> n=1	<i>C. parap.</i> n= 4
110⁴	39,32 ± 3,43 ^{AB}	19,07±17,91 ^A	3,1	56,2	18,4	14,10 ± 7,37 ^B
110⁵	35,86 ± 21,35	18,38±19,4	22,1	34,3	36,7	22,2 ± 19,25
110⁶	36,22 ± 27,28	18,2±6,88	18,5	38,5	88,1	17,57 ± 5,02
110⁷	25,39 ± 19,47	13,32±5,71	9,9	3,7	67,4	30,37 ± 12,75
110⁸	32,53 ± 25,34	15,98±13,94	13,8	9,7	44,5	15,4 ± 0,50
	<i>p</i> = 0,638	<i>p</i> = 0,929	<i>p</i> = 0,406	<i>p</i> =0,406	<i>p</i> = 0,4	<i>p</i> = 0,37

Note: ^A *p*=0.033, Mann-Whitney Test^B *p*=0.036, Mann-Whitney Test

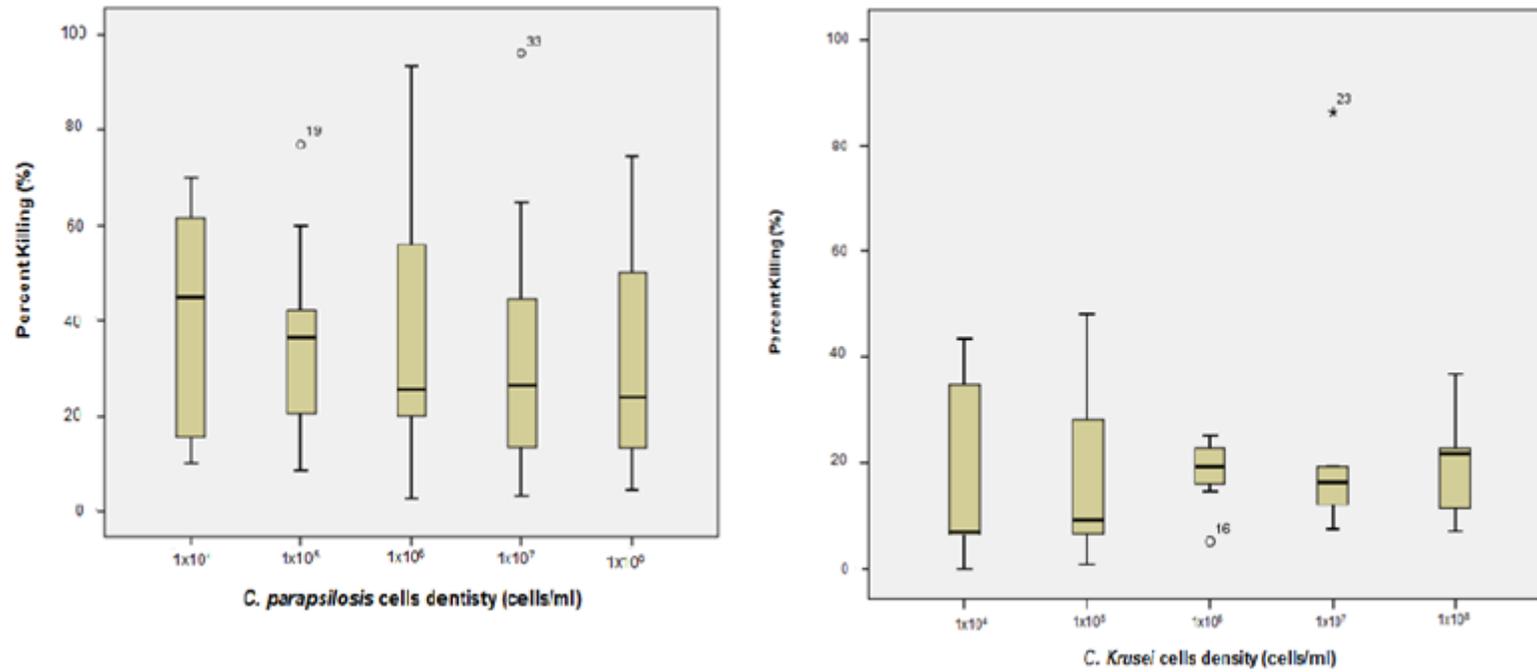


Figure 1: Anti-candidal effect of lactoferrin in *C. parapsilosis* and *C. krusei* was seen through different cell densities

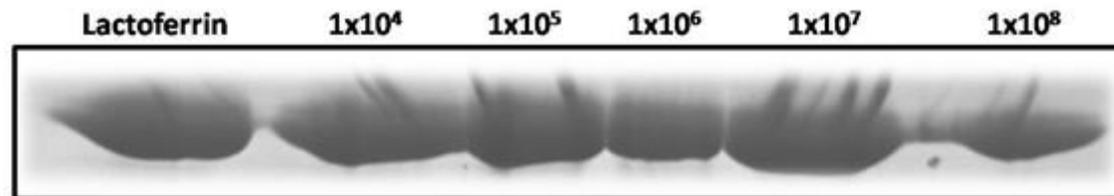


Figure 2: A representative image of degradation of lactoferrin by *Candida non-albicans* demonstrating degradation level proportional to cell density (cells/ml)

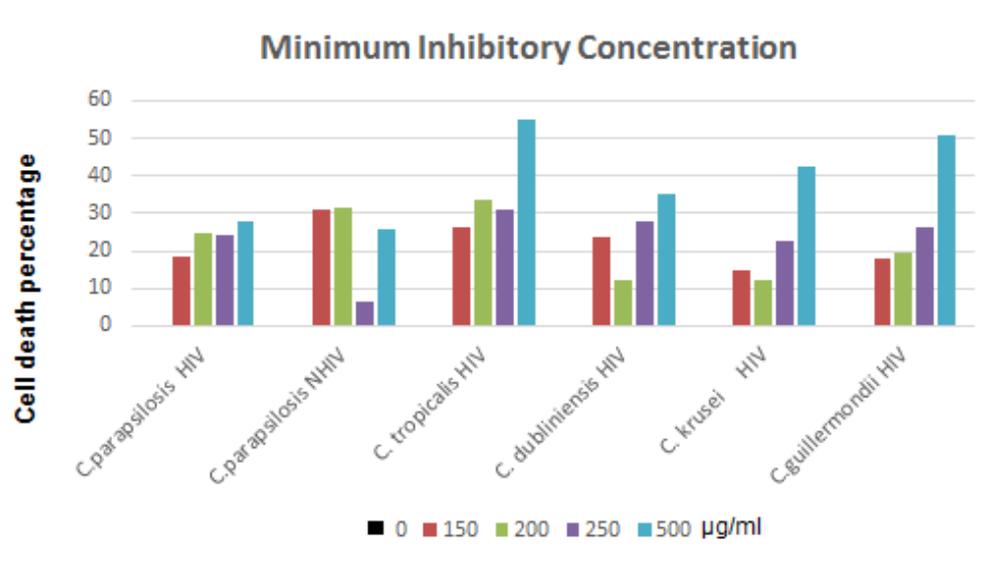


Figure 3: Minimum inhibitory concentration of lactoferrin expressed on $\mu\text{g/ml}$ in *Candida* spp. The results of cell death are expressed as percentage.

5. CONCLUSÕES

- A lactoferrina tem capacidade antifúngica em espécies de *Candida* não-*albicans* provenientes de crianças infectadas pelo HIV e saudáveis.
- Todas as espécies de *Candida* não-*albicans* foram capazes de degradar a lactoferrina quando elas estavam na concentração de 1×10^8 cells/ml.
- Lactoferrina na concentração de $500 \mu\text{g/ml}$ foi capaz de matar mais que 50% das células de *C. tropicalis* e *C. guilliermondii*.
- *C. dubliniensis* mostrou um comportamento de resistência à lactoferrina.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abubakar, A (2012). Frequency of human immunodeficiency virus infection among students of tertiary and secondary institutions in an endemic state. *N Am J Med Sci.* Apr;4(4):170-3.

Alves TP, Simoes 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.

Andre´s MT, Viejo-Díaz M, Fierro JF (2008). Human Lactoferrin Induces Apoptosis-Like Cell Death in *Candida albicans*: critical Role of K⁺-Channel-Mediated K⁺ Efflux. *Antimicrob Agents Chemotherapy* 52(11):4081–4088.

Baker HM, Baker EN (2004). Lactoferrin and iron: structural and dynamic aspects of binding and release. *Biometals* 17:209-16.

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: 383-388.

Falagas ME, Roussos N, Vardakas KZ (2010). Relative frequency of *albicans* and the various non-*albicans* *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. *Int J Infect Dis.* Nov;14(11):e954-66.

Falloon, J.: Eddy, J.: Wiener, L (1989). Human Immunodeficiency Virus Infection in Children. *J. Pediatr.* V. 114, n. 1, p. 1-30.

Farnaud & Evans (2003). Lactoferrin--a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol Immunol.*40(7):395-405

Fine DH, Furgan D, Beydouin F (2002). Lactoferrin iron levels are reduced in saliva of patients with local aggressive periodontites. *J Periondontol* 73(6):624-30.

González-Chávez SA, Arévalo-Gallegos S, Rascón-Cruz Q (2009). Lactoferrin: structure, function and applications. *Int J Antimicrob Agents* 33(4):301.

Hamza OJM (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.

Laible N, Germaine GR (1985). Bactericidal activity of human lysozyme, muramidase-inactive lysozyme, and cationic polypeptides against *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus faecalis*: inhibition by chitin oligosaccharides. *Infect Immun* 48:720–728.

Malani A, Hmoud J, Chiu L, Carver PL, Bielaczyc A, Kauffman CA. *Candida glabrata* fungemia: experience in a tertiary care center (2005). *Clin Infect Dis*. 1;41(7):975-81.

Mazurier J, SPIK G (1980). Comparative studies of the iron-binding properties of human transferrins. *Biochim. Biophys. Acta* 718: 643–658.

Muzyka & Epifanio (2013). Update on oral fungal infections. *Dent Clin North Am*. 57(4):561-81.

Naglik JR (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.

Nikawa H, Samaranayake LP, Tenovuo J, Pang KM, Hamada T (1993). The fungicidal effect of human Lactoferrin on *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Arch Oral Biol* 38:1057–1063.

Orsi N (2004). The antimicrobial activity of Lactoferrin: current status and perspectives. *Biometals* 17(3):189-96.

Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, Tendolkar S, Jones RN, Turnidge J, Diekema DJ (2010). Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for the echinocandins and *Candida* spp. *J Clin Microbiol*. 48(1):52-6.

Pongsiriwet S, Iamaroon A, Sriburee P, Pattanaporn K, Krisanaprakornkit S (2004). Oral colonization of *Candida* species in perinatally-HIV infected children in northern Thailand. *J Oral Sci* 46: 101–105.

Ramos-Gomez FJ, Flaitz C, Catapano P, Murray P, Milnes AR, Dorenbaum A (1999). Classification, diagnostic criteria, and treatment recommendations for orofacial manifestations and in HIV-infected children. *J Clin Pediatr Dent* 23:85–9.

Sanguinetti M, Posteraro B, Lass-Flörl C (2015). Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses*. 58 Suppl 2:2-13.

Sato R, Inanami O, Tanaka Y, Takase M, Naito Y (1996). Oral administration of bovine Lactoferrin for treatment of intractable stomatitis in feline immunodeficiency virus (FIV)-positive and FIV negative cats. *Am JVet Res* 57:1443–1446.

Silva RA, Lopes FF, Barreto AM (2002). Estudo clínico das manifestações orais da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida Pediátrica. *RGO* 50:7-11

Singh PK (2004). Iron sequestration by human Lactoferrin stimulates *P aeruginosa* surface motility and blocks biofilm formation. *Biometals* 17: 267-70.

Testa U (2002). Proteins of iron metabolism. *CRC press*:71-139.

Torres JM, Concepcion JL, Vielma JR (2006). Detección de lysozima and Lactoferrin porwestern blot enovas de *Trucha arcoíris* (Oncorhynchusmykiss). *MundoPecuario* 2:57–9.

Trick WE, Fridkin SK, Edwards JR, Hajjeh RA, Gaynes RP (2002). Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. *Clin Infect Dis*. Sep 1;35(5):627-30

UNAIDS – UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS. AIDS epidemic update. 2013. Disponível em: www.unaids.org

Van Veen HA, Geerts MEJ, Van Berkel PHC, Nuijens JH (2002). Analytical cation-exchange chromatography to asses the identity, purity, and N-terminal integrity of human Lactoferrin. *Anal Biochem* 309:60-66.

Ward PP, Conneely OM (2004). Lactoferrin: role in iron homeostasis and host defense against microbial infection. *Biometals* 17(3):203-8.

7. ANEXOS

Anexo 1A



UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO
UFRJ

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

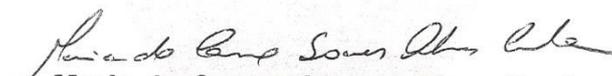
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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


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

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 especializada e através de painéis e trabalhos

científicos, tendo o participante e responsável total acesso aos mesmo, 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

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