

**ANDRÉIA APARECIDA DA SILVA**

**EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DA FAMÍLIA PLUNC NAS  
GLÂNDULAS SALIVARES MAIORES DE PACIENTES  
AUTOPSIADOS COM AIDS EM FASE AVANÇADA E SEM AIDS.**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de  
Piracicaba da Universidade Estadual de  
Campinas, para obtenção do Título de Doutor em  
Estomatopatologia na área de Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup> Lynne Bingle

**PIRACICABA**

**2009**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA

BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

Si38e Silva, Andréia Aparecida da.  
Expressão das proteínas da família PLUNC nas glândulas salivares maiores de pacientes autopsiados com AIDS em fase avançada e sem AIDS. / Andréia Aparecida da Silva. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009.

Orientadores: Pablo Agustin Vargas, Lynne Bingle.  
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Imunoistoquímica. 2. Hibridização *in situ*. I. Vargas, Pablo Agustin. II. Bingle, Lynne. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Expression of PLUNC family protein in major salivary gland of the autopsied patients with advanced AIDS and without AIDS

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Immunohistochemistry. 2. *In situ* hybridization

Área de Concentração: Patologia

Titulação: Doutor em Estomatopatologia

Banca Examinadora: Ana Lúcia Carrinho Ayroza Rangel, Sílvia Lourenço Loduca, Renata de Oliveira Mattos Graner, Ricardo Della Coletta, Pablo Agustin Vargas

Data da Defesa: 27-02-2009

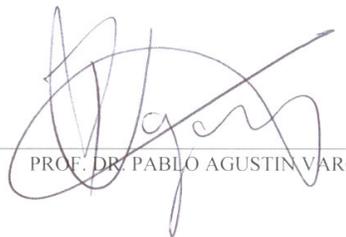
Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 27 de Fevereiro de 2009, considerou a candidata ANDRÉIA APARECIDA DA SILVA aprovada.



---

PROF. DR. PABLO AGUSTIN VARGAS



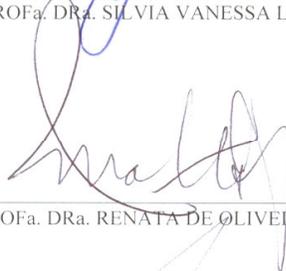
---

PROFa. DRa. ANA LÚCIA CARRINHO AYROZA RANGEL



---

PROFa. DRa. SILVIA VANESSA LOURENÇO ~~LOBUCCA~~



---

PROFa. DRa. RENATA DE OLIVEIRA MATTOS GRANER



---

PROF. DR. RICARDO DELLA COLETTA

## DEDICATÓRIA

---

À DEUS por sempre iluminar meu caminho e me conceder força para continuar sempre lutando em buscas das minhas conquistas e sonhos.

Aos meus pais José e Angelina e aos meus irmãos Leandra e André por todo incentivo e esforços não medidos durante toda minha formação acadêmica.

Ao Thiago por ter sido tão compreensivo e presente em todos os momentos...

A Dra. Lynne Bingle e Dr. Colin Bingle pela oportunidade de estagiar e trabalhar com pessoas tão dedicadas e por todo incentivo que recebi durante tempo que estive no Departamento de Patologia Oral Da Universidade de Sheffield.

Ao meu orientador Pablo Agustin Vargas por todas as oportunidades, por todo incentivo, paciência e dedicação durante todo o período de pós-graduação. Meus sinceros agradecimentos

## AGRADECIMENTOS

---

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do seu diretor, Prof. Dr. Francisco Haiter Neto;

Ao Prof. Dr. Ricardo Della Coletta, coordenador do Programa de Pós-graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP/UNICAMP;

Ao Prof. Dr. Jacks Jorge Junior, coordenador geral da pós-graduação da FOP/UNICAMP.

Ao Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida responsável pela área de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

Aos Profs. Edgard Graner, Márcio Ajudarte Lopes e Oswaldo Di Hipólito Júnior professores das áreas de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP/UNICAMP, por todos os ensinamentos e incentivos transmitidos.

Aos meus queridos amigos da pós-graduação Lucielma Salmito Soares Pinto, Eduardo Baun Campagnoli, Lays Sobral, Michele Kellermann, Jorge Esquiche León e Ana Terezinha Marques Mesquita

Aos demais amigos da pós-graduação Mário Romanach Gonzales Sobrinho, Michelle Agostine, Marco Antonio Carvalho, Daniel Berreta Moreira Alves, Lília Alves Rocha, Débora Campanella Bastos, Fabiana Seguin, Lívia Maris Ribeiro Paranaíba, Fernanda Viviane Mariano, Alan Roger Dos Santos Silva, Ana Carolina Prado Ribeiro, Patrícia do Socorro Queiroz Feio, Victor Hugo Toral Rizo, Renato Nicolás Hopp, Rose Mara Ortega, Andréia Bufalino, Bruno Augusto Benevenuto de Andrade, Adriele Ferreira Gouveia, Patrícia Gemma Strappa Abraão, Rebeca de Souza Azevedo, Camila Maria Beder Ribeiro, Joseli Assem Bersaneti, Fernanda Gonçalves Bastos, Juliana Joana de Carvalho Moraes.

Á Ana Cristina do Amaral Godoy obrigada por ser tão presente em todos os meus momentos.

Aos funcionários do laboratório de Patologia e Orocentro, Rosa Maria Fornasiari, João Carlos G. da Silva, Valéria Alessandra Prado Defávani Franco, Aparecida Conceição

Campion, Juliana Campion, Débora Cristina Gazola e Fabiana Facco Casorotti, Rogério de Andrade Elias.

A Sumita Roy, Alica e Jonh pela amizade, dedicação e ajuda durante meu estágio na Inglaterra.

À Dra. Thais Mauad do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Ao Dr. Luis Fernando Ferraz da Silva do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

As funcionárias do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo: Vera Noya, Liduvina Barros e Zilá Zila Irina Pieroni.

À Mariza Akemi Matsumoto por toda amizade e carinho.

Aos amigos Gilson, Marcelo e Gustavo pela agradável convivência.

*“A gentileza não custa nada e mesmo assim, compra coisas de valor incalculável”.*

*“Um discípulo nunca pode imitar os passos de seu guia porque cada um tem a sua maneira de ver a vida, de conviver com as dificuldades e com as conquistas. Ensinar é mostrar que é possível. Aprender é tornar possível a si mesmo”*

Paulo Coelho

## RESUMO

**Introdução:** Inúmeras lesões de origem infecciosa, cística, neoplásica e inflamatória foram reportadas nas glândulas salivares de pacientes HIV+. **Objetivos:** Os objetivos deste trabalho foram analisar e comparar a resposta do sistema imune inato (proteínas da família PLUNC) em glândulas salivares maiores, provenientes de pacientes autopsiados com AIDS e sem AIDS (grupo controle) no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual de São Paulo (FMUSP) no período de 1996 a 2000. **Material e Métodos:** Os pacientes autopsiados foram divididos em 05 grupos: grupo 01- controle (pacientes HIV negativos), grupo 02- HIV+ sem alterações nas glândulas salivares maiores, grupo 03- (micobacteriose), grupo 04 (citomegalovirose) e grupo 05 (sialadenite) para a realização de reações de imunohistoquímica para os anticorpos SPLUNC 1, SPLUNC 2 A, SPLUNC 2B e LPLUNC 1. Para o grupo controle foi realizada técnica de hibridização *in situ* para SPLUNC 2. **Resultados:** a média de idade dos pacientes selecionados para o grupo controle foi de 60,92 anos  $\pm$  9,48 anos enquanto que a média de idade dos pacientes HIV positivos foi de 37,75 anos  $\pm$  11,11. Nos casos de micobacteriose e citomegalovirose foi observada maior intensidade de marcação nas regiões próxima a área de infecção, quando comparada com áreas na periferia da lesão para os anticorpos SPLUNC 2 A e 2B. O anticorpo LPLUNC 1 foi positivo apenas nos ductos salivares e apresentou positividade em 42,22%, 51,06% e 63,88% para as glândulas parótida, submandibular e sublingual respectivamente. Com relação à hibridização *in situ*, foi observado positividade em todos os casos. **Conclusão:** a família de proteínas PLUNC pode ter papel fundamental na proteção dos organismos frente a agentes infecciosos, no entanto são necessários maiores estudos.

**Palavras-chave:** PLUNC, AIDS, glândulas salivares maiores, imunohistoquímica, hibridização *in situ*.

## ABSTRACT

**Objectives:** The aim of this study was to determine the expression of PLUNC proteins in major salivary glands (MSG) of AIDS patients with or without infectious conditions and non-HIV patients using post-mortem material. **Methods:** Sex, age, CD4 cell count, and clinical history were obtained retrospectively from the clinical records of all patients (n=63). We analysed the expression of PLUNCs (SPLUNC1, SPLUNC2, LPLUNC1) using immunohistochemistry in parotid (n=45), submandibular (n=47) and sublingual gland (n=37) samples of AIDS patients [30 with normal histology, 21 with mycobacteriosis, 14 with cytomegalovirus (CMV) infection, 30 with chronic nonspecific sialadenitis, and 30 HIV-negative controls. In situ hybridization (ISH) for SPLUNC2 in the MSG of the HIV-negative group was performed. Immunoreactivity was assessed as positive or negative. **Results:** The mean age of the patients who died of AIDS (n=63) and CD4 cell count (n=44) were 37 years and 63 cells microL(-1), respectively. The mean age of the HIV negative patients was 61 years. SPLUNC 1 expression was detected in the mucous acini of submandibular and sublingual glands, and SPLUNC2 was seen in the serous cells of the MSG. LPLUNC 1 expression was only positive in the salivary ducts of the MSG. There was a higher expression of SPLUNC2 in AIDS patients with CMV infection and mycobacteriosis when compared with all other groups. The intensity of staining for SPLUNC2 was greater around the lesions than the peripheral ones. There were no significant differences between control subjects and AIDS patients without histologic alterations or with chronic nonspecific sialadenitis. ISH for SPLUNC 2 showed perinuclear positivity in the serous cells in all HIV-negative cases. **Conclusions:** SPLUNC1 and LPLUNC1 proteins were similarly expressed in the MSG of AIDS patients and non-HIV patients. CMV infection and mycobacteriosis increase SPLUNC2 expression in serous cells in the MSG of AIDS patients. Further studies are needed to understand the biological processes involved in SPLUNC2 expression in the MSG infected by CMV and mycobacteriosis.

**Key-words:** SPLUNC1, SPLUNC2, LPLUNC1, autopsy, AIDS, major salivary glands.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

ACVH	Acidente vascular cerebral hemorrágico
BAAR	Bacilo álcool ácido resistente
BASE	do inglês <i>Breast cancer and salivary expressed</i>
BPI	Proteína de aumento da permeabilidade bactericida
BSA	Soro fetal bovino
CMV	Citomegalovírus
DC	do inglês <i>Dendritic cell</i>
dntp	Nucleósidos trifosfato e monofosfato
EGFR	do inglês <i>epidermal growth factor receptor</i>
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
gB	Glicoproteína B
gp	Glicoproteína
HAART	do inglês <i>Highly active antiretroviral therapy</i>
HIS	Hibridização <i>in situ</i>
IFN- $\gamma$	Interferon gama
H&E	Henatoxilina e eosina
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
Kb	kilobase
LBP	Proteína de ligação para lipopolissacarídeos
LNH	Linfoma não-Hodgkin
LPLUNC	do inglês <i>Long palate, lung, nasal epithelium clone</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
LTR	do inglês <i>long terminal repeats sequences</i>

MAC	do inglês <i>Mycobacterium Avium-Complex</i>
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
MHC	Molécula de histocompatibilidade principal
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NBT/BCIP	do inglês <i>Nitroblue tetrazolin-5-bromo-4-chloro-3 endolyphospate</i>
NK	do inglês <i>Natural Killer</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAAF	Punção aspirativa por agulha fina
PAS	do inglês <i>Periodic acid-Schiff</i>
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	do inglês <i>Polymerase chain reaction</i>
PLUNC	do inglês <i>Palate, lung, nasal epithelium clone</i>
RT-PCR	do inglês <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SIV	do ingles <i>simian immunodeficiency virus</i>
SLID	Síndrome linfocitária difusa
SLIP	do inglês <i>secretory leukocyte protease inhibitor</i>
SNC	Sistema nervoso central
SPLUNC	do inglês <i>short palate, lung, nasal epithelium clone</i>
SVOC	Serviço de verificação de óbito da capital
TB	Tuberculose
TNF	Fator de necrose tumoral
ZN	Ziehl-Neelsen

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
2.1. Epidemiologia da AIDS .....	3
2.2. HIV (Vírus da Imunodeficiência Adquirida) .....	4
2.3. Patogenia da AIDS .....	5
2.4. Alterações das glândulas salivares na AIDS .....	7
2.5. Sialadenite .....	8
2.6. Citomegalovirose .....	10
2.7. Micobacteriose .....	12
2.8. Histoplasmose .....	15
2.9. Criptococose .....	16
2.10. Sistema Imune Inato .....	18
2.11. PLUNC .....	25
<b>3. PROPOSIÇÃO</b> .....	31
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
4.1. Casuística .....	33
4.2. Autópsias nos casos de AIDS .....	33
4.3. Coleta de dados clínicos e das autópsias .....	33
4.4. Processamento e análise histológica .....	33
4.5. Reação imunoistoquímica .....	34
4.6. Construção da sonda de RNA para hibridização <i>in situ</i> .....	37
4.6.1. Amplificação do cDNA por PCR .....	37
4.6.2. Extração de DNA em gel de agarose .....	38
4.6.3. Clonagem .....	38
4.6.4. Transformação .....	38
4.6.5. Isolamento de DNA Plasmidial (mini prep) .....	39
4.6.6. Preparação de DNA Max plasmídeos .....	40
4.6.7. Linearização do DNA plasmidial .....	40
4.6.8. Síntese da sonda digoxigenina para SPLUNC .....	41

4.6.9. Técnica de Hibridização <i>in situ</i> .....	41
4.7. Análise estatística .....	43
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>45</b>
5.1. Grupo Controle (HIV negativo) .....	45
5.2. Grupo de pacientes autopsiados com AIDS .....	45
5.3. Aspectos microscópicos das glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais .....	46
5.4. Expressão imunoistoquímica das proteínas da família PLUNC .....	50
5.4.1. SPLUNC 1 .....	50
5.4.2. SPLUNC2 A .....	52
5.4.3. SPLUNC 2 B .....	60
5.4.4. LPLUNC 1 .....	68
5.5. Hibridização <i>in situ</i> para SPLUNC 2 no grupo controle .....	71
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>73</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	<b>81</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>83</b>
<b>APÊNDICE</b> .....	<b>99</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>119</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A pandemia da AIDS (Síndrome da Imunodeficiência adquirida) teve início na década de 80. Segundo o programa Conjunto das Nações Unidas sobre o HIV/AIDS e a Organização Mundial da Saúde (OMS), até o ano de 2007, cerca de 33.2 milhões de pessoas já foram infectadas pelo HIV no mundo, destas 15.4 milhões são mulheres e 2.5 milhões são menores de 15 anos (UNAIDS 2007). Somente no ano de 2007, ocorreram 2.5 milhões de novas infecções. As taxas de infecção estão ainda em ascensão em muitos países da África Sub-Saariana, sendo a principal causa de morte neste continente (UNAIDS 2007). No Brasil os casos de AIDS notificados pelo Ministério da Saúde atingiram 474.273 casos (Ministério da Saúde 2007). O HIV é adquirido através do sêmen, sangue e leite materno, podendo ser transmitido por relações heterossexuais, homossexuais ou bissexuais masculinos, usuários de drogas ilícitas intravenosas, receptores de sangue e hemoderivados.

Inúmeras lesões de origem infecciosa, cística, neoplásica e inflamatória foram relatadas nas glândulas salivares de pacientes HIV+. Dentre essas lesões destacam-se a histoplasmose (Raab *et al.* 1994, Vargas *et al.* 2003), tuberculose (Jakob *et al.* 1995; Singh *et al.* 1998, Vargas *et al.* 2003), infecções por *Mycobacterium avium-intracellulare* (Elvira *et al.* 1998, Rangel *et al.* 2005), criptococose (Monteil *et al.* 1997, Vargas *et al.* 2003), citomegalovirose (Pialoux *et al.* 1991, Schelleberg *et al.* 1994, Wagner *et al.* 1996, Santiago *et al.* 2000, Vargas *et al.* 2003), adenovirose (Gelfand *et al.* 1994, Duarte *et al.* 1996), pneumocistose (Wagner *et al.* 1996), salmonelose (Knee & Ohl, 1997), infecção por *Streptococcus pneumoniae* (Hanekon *et al.* 1995), linfoma não-Hodgkin (Chetty *et al.* 1996, Ioachim *et al.* 1998, Vargas *et al.* 2003), sarcoma de Kaposi (Yeh *et al.* 1989, Mukherjee *et al.* 1998; Castle & Thompson, 2000), sialolitíase (Ottaviani *et al.* 1997), lesões linfoepiteliais císticas (Uccini *et al.* 1999, Vargas *et al.* 2003) e a síndrome linfocitária infiltrativa difusa (Shugar *et al.* 1988, Mandel *et al.* 1999, McArthur *et al.* 2000, Rivera *et al.* 2003).

A imunidade inata consiste de mecanismos que existem antes da infecção, os quais são capazes de executar rápidas respostas frente ao agente agressor e que reagem essencialmente do mesmo modo nas infecções repetidas. Os principais componentes do

sistema imune inato são as barreiras físicas e químicas, tais como os epitélios e as substâncias antimicrobianas produzidas nas superfícies epiteliais; células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos e células dendríticas), células naturais killer; proteínas do sangue, incluindo o sistema complemento e outros mediadores da inflamação; e citocinas que regulam e coordenam as atividades da imunidade inata. Esse sistema é de fundamental importância nas fases iniciais da infecção, funcionando como uma barreira e facilitando uma posterior resposta imune adaptativa mediada por células T (Branger *et al.* 2004, Texereau *et al.* 2005).

A família de gene PLUNC (“Palate, lung, nasal epithelium clone”) foi recentemente descoberta em camundongos e em humanos (Weston *et al.* 1999, Bingle & Bingle 2000). Esta família é constituída por 10 membros, sendo subdividido em proteínas curtas (SPLUNC) e proteínas longas (LPLUNC). PLUNCs são expressos no trato aero superior, cavidade oral e glândulas salivares (Bingle & Bingle 2003, Vitorino *et al.* 2004, Zoul *et al.* 2006, Bingle *et al.* 2007). A função de PLUNC ainda não é totalmente conhecida, no entanto, apresenta relação com proteínas secretadas por glândulas salivares e por glândulas endócrinas da traquéia. De acordo com LeClair (2003) e Bingle & Cravem (2003), PLUNC teria as mesmas funções de proteínas do sistema imune inato como BPI (proteína de aumento de permeabilidade bactericida) e LBP (proteína de ligação para lipopolissacarídeos), isto é, apresenta uma função pró-inflamatória.

Não há nenhum estudo na literatura, até o momento, investigando a participação das proteínas da família PLUNC nas glândulas salivares maiores com ou sem lesões infecciosas de pacientes autopsiados com AIDS em fase avançada.

Os objetivos deste trabalho foram analisar e comparar a resposta da expressão das proteínas da família PLUNC em glândulas salivares maiores provenientes de pacientes autopsiados com AIDS e sem AIDS (grupo controle) no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual de São Paulo (FMUSP), no período de 1996 a 2000.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Epidemiologia da AIDS**

Os primeiros casos de AIDS foram registrados nos EUA e em cerca de 20 anos se transformou em uma epidemia de grandes proporções, com disseminação por todo o mundo. Até 2007, cerca de 33.2 milhões de pessoas foram infectadas pelo HIV, destas 30.8 milhões são adultos e 2.5 milhões são crianças menores que 15 anos, sendo que mais de 90% delas vivem em países subdesenvolvidos segundo estimativas do Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS (UNAIDS) e a Organização Mundial da Saúde (OMS). Esses números sofreram uma redução de 16% quando comparado com as estimativas publicadas pela UNAIDS em 2006 (39.5 milhões de pessoas infectadas). Somente no ano de 2007, ocorreram 2.5 milhões de novas infecções, das quais 420.000 acometeram indivíduos menores de 15 anos. Somente no ano de 2007, 2.1 milhões de pessoas morreram com AIDS (UNAIDS, 2007). Na África sub-saariana, até 2007, havia 22.5 milhões de pessoas infectadas pelo HIV, destas, 1.7 milhões ocorreram somente nesse ano. Já, nos países subdesenvolvidos da Ásia, existem 4.8 milhões de pessoas infectadas, sendo 432.000 notificados somente em 2007. Na América Latina, aproximadamente 1.6 milhões de pessoas estão infectadas pelo HIV. Para essa região há uma estimativa de que houve 100.00 novos casos em 2007 e que 58.000 pessoas foram a óbito pela doença durante o ano de 2007. De acordo com Sudhashan *et al.* (2008) ocorrem aproximadamente 14.000 novas infecções pelo HIV por dia em todo o mundo.

No Brasil, existem cerca de 660.000 indivíduos HIV+ notificados pelo Ministério da Saúde até o ano de 2007, sendo que destes, 474.273 já desenvolveram a AIDS. Esses dados constituem 1/3 da população que vive com HIV na América Latina. Foram notificados aproximadamente 193.000 óbitos por AIDS até 2007 no Brasil. Cerca de 80% dos casos de AIDS em crianças com até 13 anos de idade, é decorrente da transmissão vertical. Já a estimativa para mulheres grávidas infectadas pelo HIV é da ordem de 16.410, ou seja, 0,4% do total das gestantes. Destas, apenas 40% recebem tratamento antiretroviral (Ministério da Saúde, 2007).

## 2.2. HIV (Vírus da imunodeficiência humana)

O HIV é vírus com genoma RNA da família lentiviridae. Pertence ao grupo dos retrovírus citopático e não oncogênico que necessitam da enzima transcriptase reversa para se multiplicar. A enzima transcriptase reversa é responsável pela transcrição do RNA viral em uma cópia de DNA. Foi primeiramente descrito em 1981 (Barré-Sinoussi *et al.* 1983, Sharp & Hahn, 2008, Sudharsham *et al.* 2008). Existem duas formas de HIV geneticamente diferentes, HIV-1 e HIV-2, sendo que o HIV-1 é o tipo mais comum associado a AIDS nos EUA, Europa e África central, enquanto que o HIV-2 é mais comum principalmente na África ocidental. Entretanto parecem ter a mesma origem filogenética, originando-se do SIV (vírus da imunodeficiência símia). A via de transmissão parece ser a mesma, entretanto, o HIV-2 tem um menor risco de transmissão e pode levar a uma progressão mais lenta para a AIDS (Harris & Maher, 1996, Sudharsham *et al.* 2008). O HIV é um vírus esférico com núcleo eletrodense rodeado por um capsídeo protéico, que é envolvido por um envelope lipídico derivado da célula infectada. O núcleo contém quatro proteínas, incluindo a p24 e p17, duas fitas de RNA e uma enzima transcriptase reversa, responsável pela transcrição do RNA viral em DNA, permitindo assim que o vírus possa integrar-se ao genoma da célula hospedeira. No envelope lipídico há duas glicoproteínas, gp120 e gp41, que são fundamentais para a infecção das células pelo vírus. O genoma proviral do HIV contém aproximadamente 10.000 pares de bases com 2 LTR (long terminal repeats sequences) e 9 regiões, sendo 3 delas codificadoras dos genes maiores *gag*, *pol* e *env* que codificam os componentes estruturais e funcionais. Os produtos dos genes *gag* e *pol* são traduzidos inicialmente em proteínas precursoras grandes que devem ser clivadas pela protease viral para fornecer as proteínas maduras. Além desses três genes retrovirais comuns, o HIV contém outros genes, como *tat*, *rev*, *vif*, *nef*, *vpr* e *vpu* que regulam a síntese e montagem das partículas virais infecciosas. O gene *tat* produz a regulação na rápida replicação viral. O gene *rev* também é essencial à replicação do HIV, exercendo seus efeitos em nível pós-transcrição por regulação do transporte do RNAm viral do núcleo para o citoplasma. Os produtos dos genes *vpu* e *vif* atuam no fim do ciclo biológico viral e

parecem ser essenciais ao brotamento de vírions das células infectadas (*vpu*) e da capacidade de infectar outras células (*vif*). O gene *vpr* ajuda a aumentar a produção de vírus por diversos mecanismos, permitindo que as células incapazes de se dividir como, por exemplo, os macrófagos sejam infectados pelo HIV. Além disso, o *vpr* detém o ciclo celular na fase G2 durante a LTR viral é mais ativa, maximizando a proteção viral. Por fim, a proteína *nef* parece ser essencial ao desenvolvimento da infecção progressiva (Frankel & Young, 1998, Klatt 2004, Cotran *et al.* 2005).

### **2.3. Patogenia da AIDS**

O HIV possui capacidade de provocar mudanças imunológicas, dificultando o subsequente controle do vírus, provocando uma suscetibilidade a infecções oportunistas. A infecção pelo HIV é caracterizada por uma imunossupressão profunda, que afeta primariamente a imunidade celular, devido a uma perda acentuada de células T CD4+ e de um comprometimento da função das células T auxiliares sobreviventes (Cadogan & Dalgleish, 2008, Sudharshan *et al.* 2008). Existem evidências científicas de que a molécula CD4 é um receptor de alta afinidade para o HIV. Isso ocorre porque a glicoproteína gp 120 presente na membrana do HIV tem afinidade pelas moléculas CD4+ dos linfócitos. Essa proteína liga-se a outras moléculas da superfície celular, ou seja, a co-receptores, para que o vírus consiga entrar na célula. Duas moléculas de superfície celular, a CCR 5 (receptores das  $\beta$ -quimiocinas) e CXCR 4 (receptores de  $\alpha$ -quimiocinas) exercem esse papel, formando um novo local de reconhecimento em gp 120 para esses co-receptores. Outra proteína denominada de gp 41 auxilia no processo de fusão do vírus com a membrana celular das células T ou macrófagos alvo. Após a fusão, o cerne viral contendo o genoma do HIV entra no citoplasma celular (Cayabyab *et al.* 2004, Sudharshan *et al.* 2008). Uma vez dentro da célula, o genoma viral sofre transcrição reversa, levando a formação de cDNA (DNA pró-viral). Em células T quiescentes, o cDNA pode permanecer em uma forma epissômica linear. Nas células T em divisão, o cDNA adquire uma forma circular, entra no núcleo e integra-se ao genoma do hospedeiro. Embora a redução acentuada de células TCD4+ possa ser responsável pela maior parte da imunodeficiência nos estágios avançados da infecção pelo HIV, há evidências de que se podem detectar defeitos qualitativos nas células T até

mesmo em indivíduos assintomáticos (Cotran *et al.* 2005, Cadogan & Dalgleish 2008). Tem sido demonstrada uma aparente disfunção nas células T helper de pacientes HIV+ assintomáticos independentes do número de células CD4 e do estágio clínico (Clerici *et al.* 1989, Clerici & Shearer 1993). Alterações na produção e regulação de citocinas por linfócitos Th (helper) CD4 tem importante efeito nos eventos imunológicos associados à doença (Graziosi *et al.* 1994, Maggi *et al.* 1994). As células Th são definidas pelas citocinas que sintetizam. Sendo assim as células Th1 produzem Interferon (IFN- $\gamma$ ), Interleucina 2 (IL-2) e Fator de necrose tumoral (TNF- $\beta$ ); as células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 (Yssel *et al.* 1992, Graziosi *et al.* 1994, Maggi *et al.* 1994); as células Th0 secretam todas as citocinas citadas anteriormente (Yssel *et al.* 1992, Del Prete *et al.* 1993, Veronesi *et al.* 2000). Porém, não há uma associação precisa entre a distribuição dos grupos de células Th e a progressão da doença. Clerenci & Shearer (1993) sugerem que a resistência, em contraste com a progressão para a AIDS é dependente do predomínio de resposta Th1 sobre Th2, e ao invés disso favorece a expressão do fenótipo Th0. Além disso, estudos “*in vitro*” mostram que clones Th2, e principalmente Th0, suportam a replicação viral enquanto isso não é observado em clones Th1 testados (Maggi *et al.* 1994). Sendo assim, as diferentes citocinas produzidas pelos grupos de células Th e as secretadas por outros tipos de células regulam a resposta imune do hospedeiro à infecção do HIV.

Por outro lado, tem sido demonstrado que uma aparente disfunção nas células Th de pacientes HIV+ assintomáticos pode ocorrer independentemente do número de células CD4 e do estágio clínico (Clerenci *et al.* 1989, Clerenci & Shearer 1993). Portanto, os defeitos qualitativos que podem ser observados nas células T incluem: redução na proliferação de células T induzidas por antígenos, diminuição das respostas Th1 em relação ao tipo Th2 e defeitos da sinalização intracelular. O desequilíbrio entre respostas Th1 e Th2 favorece as respostas humorais sobre a imunidade celular.

Em decorrência das inúmeras alterações que ocorrem no sistema imunológico, os pacientes apresentam linfopenia, redução da função das células T com perda de células de memória, suscetibilidade a infecções oportunistas, neoplasias, diminuição da hipersensibilidade do tipo tardio; alterações das células B e alterações nas funções de

macrófagos e monócitos com redução da quimiotaxia, fagocitose e capacidade de apresentação de antígeno.

Desta forma o sistema imunológico vai sendo lenta e progressivamente deteriorado ficando suscetível ao desenvolvimento de uma série de doenças oportunistas, que pode culminar na morte do paciente (Cotran *et al.* 2005).

Entre 1995-1996, com a introdução da terapia antiretroviral altamente ativa (TARV ou HAART), ou seja, uma combinação de pelo menos três diferentes classes de medicamentos no tratamento desses pacientes ocorreu um aumento na qualidade de vida e o índice de mortalidade relacionada ao HIV caiu de 29.4 em cada 100 pessoas infectadas para 8.8 em cada 100 pessoas por ano somente em 1997 (Palella *et al.* 1998). Na maioria dos pacientes infectados pelo HIV, a HAART reduz drasticamente a carga viral do HIV e aumenta a contagem dos linfócitos TCD4, diminuindo a incidência de infecções oportunistas (Sudharshan *et al.* 2008).

Após 20 anos de pesquisa e mais de 85 pesquisas clinicas usando vários tipos de vacina houve pouco progresso no desenvolvimento de vacina efetiva para o HIV/AIDS. Essa dificuldade se deve a três obstáculos principais. O primeiro é que o vírus entra rapidamente no genoma das células T de memória constituindo um reservatório do qual o vírus não pode ser desalojado. O segundo obstáculo envolve uma hipervariabilidade genética do vírus que pode facilmente evitar defesas imunes do hospede por mutação. O terceiro obstáculo é que nós somos incapazes de produzir anticorpos que possam neutralizar cepas virais selvagens e de bloquear precocemente a infecção (Girardi, 2007).

#### **2.4 Alterações das glândulas salivares maiores na AIDS**

As lesões mais comuns nos pacientes com AIDS são infecções oportunistas de origem bacteriana, fúngica, viral ou de protozoários, ocorrendo também neoplasias e lesões linfoepiteliais e outras de etiologia desconhecida. Diversos estudos avaliaram as doenças de glândulas salivares em pacientes HIV+. Magalhães *et al.* (2001) estudaram 38 crianças HIV+ no Brasil, encontraram aumento bilateral das glândulas parótidas em 18,42%. Já Matee *et al.* (2000) detectaram aumento de volume das glândulas parótidas em 20%, 12% e 5% dos pacientes com AIDS, HIV+ e HIV-, respectivamente. O envolvimento da glândula

submandibular ocorreu em 29,6%, 31,3% e 14,7% destes pacientes, respectivamente. A prevalência do aumento das glândulas parótida e submandibular, sobretudo nesta última, é surpreendentemente alto, em comparação aos 2,4% relatados por Tukuruku *et al.*(1990) e aos 4,3% por Mulligan *et al.* (2000). A doença das glândulas salivares associadas ao HIV (DGS-HIV) é caracterizada por aumento de volume glandular sem sintomatologia dolorosa (Schrot *et al.* 1997, Mulligan *et al.* 2000). Este aumento de volume pode corresponder a neoplasias (Sarcoma de Kaposi, linfoma não-Hodgkin) e lesões não neoplásicas (lesão linfoepitelial benigna, síndrome linfocitária infiltrativa difusa, linfadenopatia parotídea, cistos parotídeos multicêntricos associados a adenopatia cervical), ocorrendo preferencialmente em crianças, sendo a parótida o local mais afetado, com acometimento bilateral em 60% dos casos (Schiodt, 1992). Lesões infecciosas também já foram encontradas nas glândulas salivares maiores de pacientes com AIDS. Vargas *et al.* (2003) estudando 100 glândulas parótidas de pacientes autopsiados com AIDS em fase avançada, encontraram 02 casos de histoplasmose, 03 casos de criptococose, 09 casos de citomegalovirose, 10 casos de micobacteriose. Já Léon *et al.* (2008) estudando 103 glândulas submandibular e 92 glândulas sublingual encontraram 11 e 7 casos de micobacteriose para as glândulas submandibular e sublingual respectivamente, 14 e 02 casos de citomegalovirose para as glândulas submandibular e sublingual respectivamente, além de 03 e 04 casos de criptococose em cada uma das glândulas.

## **2.5. Sialadenite**

As sialadenites compreendem todos os processos inflamatórios que acometem nas glândulas salivares e são acompanhadas de dor, aumento de volume e redução do fluxo salivar da glândula acometida. Elas podem ser classificadas em agudas ou crônicas (Werning *et al.* 1990, Gomes *et al.* 2006). A patogênese das sialadenites não é completamente compreendida, mas é provável que envolva uma combinação de diversos fatores etiológicos que contribuem para a redução do fluxo salivar (Gomes *et al.* 2006). Alguns fatores sistêmicos podem predispor o paciente a um quadro inflamatório das glândulas salivares, sendo assim pacientes em estado de imunossupressão, como diabetes, alcoolismo, desordens auto-imunes como a Síndrome de Sjogren, diminuição do fluxo

salivar secundária a medicamentos como antidepressivos, anticolinérgicos e diuréticos (Nusem-Horowitz 1995, Matsuo *et al.* 1997).

A sialadenite aguda é mais comum na glândula parótida, sendo bilateral em 10 a 25% dos casos. As manifestações clínicas incluem eritema, edema, aumento de temperatura e enrijecimento da área glandular afetada. Alguns pacientes apresentam febre, juntamente com queixa de dor. O envolvimento do parênquima glandular pelo processo inflamatório e a subsequente estimulação dos nervos sensoriais próximos à cápsula da glândula contribuem para a dor associada. Ao exame intra-oral, a abertura do ducto salivar se mostra eritematosa e uma coleção purulenta pode ser drenada da glândula quando a mesma é palpada, no caso de infecção bacteriana, sendo esta situação a mais frequente (Saunders *et al.* 1991, Nusem-Horowitz (1995).

Com o advento da AIDS é comum encontrar infecções bacterianas, fúngicas e virais associadas à sialadenites. Santiago *et al.* (2000) diagnosticou através da PAAF um caso de infecção por CMV associado a sialadenite em paciente HIV+. Vargas *et al.* (2003) em estudo de 100 glândulas parótidas de pacientes autopsiados com AIDS, encontraram 29 casos de sialadenites apresentando infiltrado discreto, moderado e intenso em 66, 10 e 24% respectivamente. Já Léon *et al.* (2008) encontraram 25 casos de sialadenite em 102 glândulas submandibulares e em 25 casos nas glândulas sublinguais de 92 pacientes autopsiados com AIDS. Léon *et al.* (2008) encontrou também 12 e 6 casos de sialadenite granulomatosa associadas à co-infecções nas glândulas submandibular e sublingual, respectivamente.

Obstruções ductais recidivantes ou persistentes (mais comumente devido à sialolitíase) podem levar a uma sialadenite crônica (Gomes *et al.* 2006).

A síndrome linfocitária infiltrativa difusa (SLID) é uma doença que ocorre em pacientes HIV+ caracterizada por aumento das glândulas salivares e lacrimal. Outras características dessa síndrome incluem persistente circulação de linfócitos TCD8 no sangue periférico, infiltração linfocitária TCD8 difusa nos tecidos associadas a uma adenopatia generalizada (Itescu *et al.* 1992, Madel *et al.* 1998, Basu *et al.* 2006). O pulmão é o órgão extraglandular mais comumente acometido, sendo que o fígado, trato gastrointestinal, rins (Itescu, *et al.* 1990), músculos e sistema nervoso periférico (Moulingnier *et al.* 1997) são os

órgão menos frequentemente acometidos. Alterações nas glândulas salivares menores em pacientes HIV+ já foram descritas, apresentando-se geralmente como sialadenite focal, os quais são similares ao da Síndrome de Sjogren. O infiltrado é predominantemente composto por linfócitos CD8 (CD4/CD8 = 0,5) (Itescu *et al.* 1989, Schiødt *et al.* 1989), o que contrasta com a relação CD4/CD8 de 3 a 8 observadas na Síndrome de Sjogren clássica.

## **2.6. Citomegalovirose**

O citomegalovírus (CMV) é um vírus de dupla fita de DNA, pertencente à família *Herpesviridae* (Lewin-Smith *et al.* 1998). A infecção das glândulas salivares pelo CMV era uma condição rara, que em geral afetava recém nascidos devido à infecção transplacentária, e menos provavelmente a uma infecção do cérvix após a ruptura da membrana amniótica, podendo causar debilidade fetal, retardo no desenvolvimento, nascimento prematuro, microcefalia, hidrocefalia com calcificação periventricular, corioretinite, trombocitopenia, púrpura e hepatite. Os rins e os pulmões são os órgãos mais acometidos, sendo que nesses pacientes, os corpúsculos de inclusão citomegálica foram observados principalmente nas células epiteliais (Ko *et al.* 2000, DeVries, 2007, Maruyana *et al.* 2007,). Atualmente, essa condição também tem sido diagnosticada em adultos com imunossupressão, sendo uma das infecções oportunistas mais importantes em pacientes infectados pelo HIV (Steininger *et al.* 2006). Clinicamente a doença se caracteriza por febre, aumento de volume das glândulas salivares, hepatoesplenomegalia e linfocitose. O CMV pode ser isolado no sangue, urina, (Langford *et al.* 1990), sêmen, secreções vaginais, leite materno, lágrimas, saliva (Correia-Silva *et al.* 2007) e fezes. Afeta principalmente as células ductais epiteliais e o endotélio dos vasos sanguíneos (Kanas *et al.* 1987). A exposição pelo CMV é muito comum na população. De acordo com de Correia-Silva *et al.* (2007), a soroprevalência tem sido entre 80 e 90% na população geral e em cerca de 94% de homens homossexuais, indicando uma infecção latente (Kanas *et al.* 1987).

O CMV na AIDS pode se manifestar como pneumonite (Steininger *et al.* 2006, Marchevsky *et al.* 1985), esofagite ou enterocolite (Rotterdam *et al.* 1985, Steininger *et al.* 2006) e encefalite (Rhodes, 1987, Steininger *et al.* 2006). A detecção do DNA do CMV no

flúido cérebro-espinhal mostra-se de alto valor diagnóstico para a doença ativa no SNC de pacientes com AIDS (Stanojevic *et al.* 1987). O CMV pode ser também detectado na saliva de pacientes HIV + ou imunocomprometidos (Marder *et al.* 1985, Correia-Filho *et al.* 2007). De acordo com Correia-Filho *et al.* (2007), as glândulas salivares são os locais preferidos para a persistência do CMV. A reprodução do vírus nas glândulas salivares e subsequente liberação na saliva é um veículo fundamental para a transmissão horizontal do CMV na população em geral.

A predileção do CMV por glândulas salivares em pacientes com AIDS é conhecida. Vargas *et al.* (2003) em estudo de 100 autopsias encontraram 9 casos de infecção pelo CMV nas glândulas parótidas. Todos os casos apresentaram CMV no parênquima e apenas 1 caso mostrou além da infecção no parênquima, infecção no linfonodo intraparotídeo. Ihrler *et al.* (1996), relataram 47 casos de infecção pelo CMV de um total 88 casos de autopsias, destes, 28 acometeram a glândula parótida. Wax *et al.* (1994) descreveram 3 casos de sialadenite parotídea por CMV, os quais foram diagnosticados por punção aspirativa por agulha fina (PAAF). Santiago *et al.* (2000) também relatou um caso de sialadenite por CMV na glândula parótida de homem portador de HIV. O CMV foi detectado em células acinares das glândulas submandibulares de pacientes com AIDS por Pialoux *et al.* (1991) e Schelleberg *et al.* (1994). Wagner *et al.* (1996) detectaram CMV em 10 de 60 glândulas submandibulares de pacientes autopsiados com AIDS. Léon *et al.* (2008) em recente estudo de 103 glândulas submandibulares e 92 glândulas sublinguais de pacientes autopsiados com AIDS em fase avançada, detectaram infecção pelo CMV em 14 e 2 casos para as glândulas submandibular e sublingual respectivamente.

Os sintomas mais frequentes relatados por pacientes são de xerostomia devido à diminuição do fluxo salivar. Greenberg *et al.* (1995) e Greenberg *et al.* (1997) encontraram uma relação fortemente significativa entre a presença do CMV na saliva e queixa de xerostomia, sugerindo que o CMV pode ser a causa da disfunção das glândulas salivares em pacientes com AIDS. Esses achados são corroborados pelo fato de que o dano celular é causado pelo efeito citopático direto do CMV, visto que em muitos casos apresentam um infiltrado inflamatório discreto e ausência de resposta inflamatória (Ko *et al.* 2000, Vargas *et al.* 2003).

Após a introdução da HAART, a qualidade de vida dos pacientes infectados pelo HIV aumentou drasticamente com a supressão da persistente viremia pelo HIV, ocorrendo dessa forma, uma redução significativa na incidência do desenvolvimento de doença pelo CMV. No entanto, mesmo na era da HAART, um número considerável de pacientes infectados pelo HIV, tem um contagem de células CD4 abaixo de  $<100\text{mm}^{-3}$ , o que deixa o paciente suscetível ao desenvolvimento da doença (Steininger *et al.* 2006).

Recentemente foi demonstrado por Rocha *et al.*(2008) que a infecção por CMV aumenta a secreção de SLIP (Secretory leukocyte proteinase inhibitor) nas glândulas submandibulares de pacientes com AIDS e que pode estar associada com diferentes eventos tais como a proteção contra a infecção, ação de proteinases derivadas das células inflamatórias, além de promoção de reparo tecidual.

As drogas usadas na terapêutica para infecção pelo CMV incluem foscarnet, ganciclovir e cidofovir (Katlama, 1996). Para as lesões isoladas, como úlceras orais, sem envolvimento sistêmico, pode ser usado aciclovir por via oral (Greenspan & Shirlaw, 1997).

## **2.7. Micobacteriose**

A tuberculose (TB) é uma doença bacteriana causada por *Mycobacterium tuberculosis* e ocasionalmente por outras espécies como *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium africanum*. A transmissão ocorre pelo ar através de perdigotos, espirro ou tosse de indivíduos com TB pulmonar. A transmissão geralmente ocorre em locais fechados, escuros e sem ventilação. O risco do indivíduo se infectar depende do tempo de exposição e da susceptibilidade do mesmo. Uma vez infectado, o indivíduo permanece neste estado por muitos anos e a maioria, (90%) das pessoas HIV negativas infectadas com *Mycobacterium tuberculosis* não desenvolvem a doença, entretanto, pessoas com AIDS podem desenvolver TB a qualquer momento (Harries & Mayer, 1996). Vários fatores podem acarretar o desenvolvimento da doença, como por exemplo, o estresse físico e emocional, subnutrição, e principalmente co-infecções associadas ao HIV.

A TB pode acometer diferentes órgãos, sendo o pulmão é o órgão mais frequentemente envolvido. Antes da pandemia do HIV, 80 a 85% dos novos casos

notificados de TB referiam a doença pulmonar isolada, 4 a 5% dos casos ao comprometimento pulmonar associado com a doença extrapulmonar e apenas 15% dos casos à doença extrapulmonar isolada. Embora nos pacientes infectados pelo HIV o acometimento dos sítios extrapulmonares seja mais freqüente, a forma pulmonar continua sendo responsável por 60 a 70% dos casos notificados de co-infecção TB/HIV nos Estados Unidos da América (Mello, 2001). De acordo com uma pesquisa de Crump & Reller (2003) a TB disseminada apresenta algumas condições predisponentes como: a infecção pelo HIV, terapia imunossupressora, alcoolismo, diabetes mellitus e doenças hematológicas. Menon *et al.* (2007) revisaram 128 casos de tuberculose na região de cabeça e pescoço em um período de 10 anos em população do Reino Unido, destes, 5 casos acometeram glândulas salivares (1 caso em glândula parótida e 4 casos em glândula submandibular).

A pandemia da AIDS tem propiciado o desenvolvimento de TB causada por outras espécies ditas não-tuberculosas. Antes da pandemia, micobactérias não tuberculosas raramente causavam doença, mesmo em indivíduos imunocomprometidos. A profunda e prolongada supressão do sistema imune celular, observada na AIDS, favorece que microrganismos relativamente avirulentos possam causar a doença. Portanto, desde que a AIDS surgiu, novas doenças causadas por micobactérias com manifestações clínicas diferentes têm sido descritas. Desde então, novas espécies têm sido descobertas e os esforços têm se concentrado nas áreas de diagnóstico, tratamento e prevenção destas infecções (Gittiniger *et al.* 2008, French *et al.*1997). Lawn *et al.* (2007) descreveram o primeiro caso de paciente HIV+ com infecção bi-lateral de glândula parótida por *Mycobacterium scrofulaceun*. Ohtomo *et al.*(2000) avaliando 43 casos de autópsias em pacientes HIV+, observaram que 17 casos foram acometidos pelo *Mycobacterium avium* (MAC) usando a técnica de PCR. Rangel *et al.* (2005) estudando 10 casos de micobacteriose parotídea, identificaram através da PCR 8 casos de *Mycobacterium tuberculosis*, e 2 casos foram acometidos por MAC, sendo que 1 caso apresentou co-infecção por MTB e MAC.

O padrão histológico da tuberculose reflete a imunidade celular dos pacientes. Pacientes com imunidade celular intacta possuem resposta ganulomatosa típica com poucos bacilos (Lewin-Smith *et al.* 1998). Caso ocorra uma diminuição do número de linfócitos

TCD4 ocorre uma diminuição da imunidade celular, diminuindo a formação de células gigantes tipo Langhans e células epitelióides. No estágio hiporeativo a necrose caseosa central possui inúmeros bacilos, tanto na área de necrose quanto nos macrófagos, sendo detectados pela coloração de Ziehl-Neelsen (ZN). Nos estágios finais da AIDS, há uma resposta piohistiocitária com numerosos bacilos (Lewin-Smith *et al.* 1998).

A infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* nas glândulas salivares é rara mesmo nos países onde a doença é comum (Janmeja *et al.* 2003). Os pacientes não apresentam sintomas específicos de tuberculose, principalmente na ausência de história de tuberculose pulmonar, apresentando-se com tumefação. Sendo assim, é praticamente impossível diferenciar tuberculose de sialadenite crônica inespecífica ou de tumores neoplásicos da parótida (Comeche Cerverón *et al.* 1995). A glândula parótida é o local mais comum de envolvimento extranodal em glândulas salivares pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mullis *et al.* 2000), iniciando principalmente nos linfonodos intraparotídeos, usualmente sem evidência de comprometimento pulmonar (Cleary & Batsakis, 1995, Comeche Cerveron *et al.* 1995). No entanto, outros autores acreditam que a glândula submandibular seja a mais acometida (Taher 1988, Esteban Sanchez *et al.* 1993). Recentemente, León *et al.* (2008), estudando glândulas submandibulares (n=103) e sublinguais (n= 92) de pacientes que foram a óbito em fase avançada encontrou 11 casos de micobacteriose em glândula submandibular e 7 casos em glândula sublingual.

Gittinger *et al.* (2008) relataram um caso de infecção pelo MAC em glândula parótida de paciente com história de poliartrite reumática que estava fazendo uso de glicocorticóide. Vargas *et al.* (2003) reportaram a ocorrência de 10 casos de micobacteriose na glândula parótida de 100 pacientes autopsiados com AIDS em fase avançada, todos os casos acometeram os linfonodos intraparotídeos e em apenas 2 casos o parênquima parotídeo foi acometido. Sing *et al.* (1998) demonstraram a presença de tuberculose principalmente em linfonodos cervicais (89% dos 38 casos), enquanto os outros locais acometidos foram a pele, laringe e parótida, perfazendo 11% dos 38 casos.

As colorações de rotina como ZN ou Wade-Fite, permitem detectar micobactérias em 27% a 60% dos casos. O diagnóstico molecular baseado no seqüenciamento do DNA através de técnicas especiais, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) tem se

mostrado útil na identificação de espécies de micobactérias e mutações associadas a resistência antimicrobiana (Cleary & Batsakis, 1995). Ohtomo *et al.* (2000) avaliando 43 casos de autópsias em pacientes HIV+, observaram 17 (40%) casos acometidos pelo *Mycobacterium avium* através de PCR.

Excisão total ou parcial, de acordo com o tipo de glândula afetada, pode ser indicado seguido de quimioterapia antituberculosa múltipla por 1 ou dois anos . Os linfonodos adjacentes também devem ser removidos (Stanley *et al.* 1983). A quimioterapia inclui o uso de rifampicina, isoniazida, estreptomicina, pirazanamida, claritromicina, etambutol, rifabutin e ciprofloxacina (Elvira *et al.* 1998). Uma combinação de claritromicina e inibidores de protease aumentaram a sobrevida de pacientes HIV+ com MAC disseminada (Horsburg *et al.* 2001). Na tentativa de impedir a ocorrência de interações medicamentosas, regimes que não contenham rifampicina devem ser empregados em pacientes HIV+ tratados com inibidores de proteases ou inibidores de transcriptase reversa não nucleosídeos (Jerant *et al.* 2000).

## **2.8. Histoplasmose**

A histoplasmose é uma micose profunda causada pelo *Histoplasma capsulatum*. É um fungo dimórfico encontrado particularmente no centro-oeste dos EUA, América Latina, Índia e Austrália (Valle *et al.* 2006, Almeida & Scully 1991). O *Histoplasma capsulatum* é encontrado em ambiente quente e úmido que contém excrementos de pássaros e morcegos (Hernández *et al.* 2004). A contaminação ocorre através da inalação dos esporos (Alcure *et al.* 2006). Alguns sintomas da doença incluem febre, fraqueza, perda de peso, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, odinofagia e lesões mucocutâneas (Ferreira *et al.* 2002).

Histoplasmose disseminada é uma complicação comum em pacientes com AIDS (Lewin-Smith *et al.* 1998). De 30 a 60% dos pacientes com histoplasmose disseminada apresentam lesões orais (Hernández *et al.* 2004). As lesões orais de histoplasmose são usualmente ulceradas ou nodulares, localizadas em quase todas as áreas da cavidade oral, sendo os locais mais comumente afetados a língua seguida pelo palato duro, palato mole,

bochecha, lábios e gengiva (Fowler *et al.* 1989, Heinic *et al.* 1992, Ferreira *et al.* 2002, Valle *et al.* 2006, Wheat, 2006).

O diagnóstico histológico é confirmado pelas colorações de ácido-periódico de Schiff (PAS) ou Grocott-Gomori as quais podem identificar esporos de *Histoplasma capsulatum*. Diferentes padrões histológicos podem ser identificados, tais como granulomas, microabscessos, necrose ou reação magrofágica difusa (de Almeida & Scully, Vargas *et al.* 2003).

Anfotericina B é a droga de escolha para pacientes imunocomprometidos (Hernández *et al.* 2004, Valle *et al.* 2006). O Cetaconazol é a droga alternativa no tratamento de histoplasmose (Hernández *et al.* 2004, Minamoto & Armstrong 1988), entretanto, fluconazol ou itraconazol também podem ser usados (Klei, 1989).

Foram descritos inúmeros casos de histoplasmose oral em pacientes HIV+ (Fowler *et al.* 1989, Heinic *et al.* 1992, Scully & Almeida 1997). De Faria *et al.* (2005) estudando 92 casos de língua de pacientes HIV+ autopsiados, detectou histoplasmose em apenas 1 caso. Hernández *et al.* (2004) em estudo de 733 pacientes HIV+, encontraram 21 casos de histoplasmose oral. Vargas *et al.* (2003) relataram 2 casos de histoplasmose acometendo a glândula parótida de pacientes com AIDS, sendo que as lesões afetavam o parênquima glandular em um caso e os linfonodos intraparotídeos em outro. Não há relatos de histoplasmose nas glândulas submandibular e sublingual de pacientes HIV+ na literatura inglesa.

## **2.9 Criptococose**

Criptococose é uma infecção fúngica causada pelo *Cryptococcus neoformans*, uma levedura basidiomiceto que habita o solo, a qual é adquirida por inalação (Monteil *et al.* 1997, Scully & Almeida, 1997). Duas variedades de *Cryptococcus neoformans* têm sido descritas, *neoformans*, encontrada nas fezes, de pássaros e em frutas e vegetais em decomposição, e raramente, *gatti*, encontrada associada à árvore *Eucaliptud camaldulensis* (Ellis & Pfeiffer, 1992, Rodrigues *et al.* 1999). A doença aparece de duas formas básicas, criptococose pulmonar e pela disseminação hematogênica, criptococose cerebral (Monteil *et al.* 1997). O local mais comum de infecção é o pulmão, já os locais menos comuns são a

pele, próstata, olhos, ossos e articulações (Kantarcioğlu *et al.* 2006). Em pessoas saudáveis, a infecção criptocócica é usualmente subclínica (Scully & Almeida, 1997), porém em pessoas imunologicamente comprometidas como pacientes com AIDS, neoplasia, imunossupressão ou em terapia com corticosteroide, pode ocorrer a doença disseminada (Monteil *et al.* 1997). Os sinais clínicos incluem febre, tosse e dispnéia, enquanto que sintomas como confusão mental e defeitos neurológicos estão associados a um pior prognóstico (Known-Chung *et al.* 2000).

A criptococose pode provocar meningoencefalite, o que constitui a principal causa de morbimortalidade em 5 a 10% dos pacientes com AIDS (Vecchiarelli *et al.* 1998), podendo ocorrer também em pacientes com leucemia, linfoma, lúpus eritematoso sistêmico, doença de Hodgkin, sarcoidoses e em transplantados (Levitz 1992).

Lesões orais de criptococose na AIDS foram relatadas por Schmidt-Westhausen *et al.* (1995) na gengiva, a qual apresentou como ulceração única, sem disseminação da doença, porém mostrou sorologia para o antígeno criptocócico, a qual se tornou negativa após 4 semanas de tratamento com Anfotericina B e flucitosina. Glick *et al.* (1987) relataram lesão em palato, sendo indício de criptococose disseminada em pacientes com AIDS. De Faria *et al.* relataram um caso de criptococose em língua de paciente autopsiado com AIDS. Outras lesões foram descritas na língua, faringe, mucosa jugal, alvéolo dentário e pilares tonsilares, as quais se apresentaram como úlceras ou nódulos (Lynch & Naftolin 1987, Dodson *et al.* 1989, Tzerbos *et al.* 1992, Kuruvilla *et al.* 1992).

Nas glândulas salivares Vargas *et al.* (2003) reportaram a ocorrência de criptococose na glândula parótida em 3 de 100 pacientes com AIDS autopsiados. Monteil *et al.* (1997) relataram um caso de criptococose disseminada acometendo a glândula parótida e glândulas salivares labiais em paciente com AIDS. Tanto nos casos relatados por Vargas *et al.* (2003) quanto no caso relatado por Monteil *et al.* (1997) não havia presença de reação inflamatória. A reação tecidual ao *Cryptococcus neoformans* pode variar desde uma reação ausente ou pequena até uma reação granulomatosa com vários graus de necrose (Monteil *et al.* 1997). Léon *et al.* (2008) em recente trabalho, encontraram 3 casos de criptococose em glândula submandibular e 4 casos de criptococose em glândula sublingual de pacientes autopsiados com AIDS em fase avançada.

O diagnóstico é confirmado pela microscopia óptica, onde as colorações de PAS, Mucicarmim e Grocott-Gomori mostram os fungos redondos, elípticos ou em forma de bote ou taça com 4-10  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Scully & Almeida 1997).

Anfoterecina B junto com a flucitocina e associada com drogas como cetoconazol, fluconazol, e itraconazol representam o maior avanço na terapia sistêmica antifúngica (Saag *et al.* 1999, Bicanic *et al.* 2008).

## **2.10. Sistema Imune Inato**

O organismo tem dois tipos de resposta frente à invasão de um patógeno: a resposta imune inata e a adaptativa. Os mecanismos da imunidade inata são a primeira linha de defesa contra infecção (Bingle *et al.* 2003), está sempre presente e podem ser ativados rapidamente, no entanto, nem sempre tem a capacidade de eliminar a infecção. A imunidade inata consiste de mecanismos que existem no organismo antes deste ser submetido à infecção (Janeway & Medzhitov, 2002), são capazes de realizar rápidas respostas frente ao agente agressor e reagem essencialmente do mesmo modo as infecções repetidas. A resposta imune inata tem uma especificidade única para os produtos dos micróbios que, sob vários aspectos, diferem da especificidade do sistema imune adquirido, sendo assim, tanto as respostas imunes inata e adquirida compõem um sistema integrado de defesa do hospedeiro, no qual numerosas células e moléculas funcionam cooperativamente (Abas *et al.* 2002).

Os principais componentes da imunidade inata são: barreiras físicas e químicas, tais como os epitélios e as substâncias antimicrobianas produzidas nas superfícies epiteliais, células fagocíticas (neutrófilos e macrófagos), células natural killer, proteínas do sangue, incluindo membros do sistema complemento e outros mediadores da inflamação, e citocinas que regulam e coordenam muitas atividades celulares na imunidade inata.

### Barreiras Epiteliais

As superfícies epiteliais íntegras formam barreiras físicas contra micróbios externos, assim, a pele, superfícies mucosas do trato gastrointestinal e trato respiratório são protegidos por epitélio contíguo que impedem a entrada de microrganismos, onde a perda

da integridade destes epitélios predispõe a infecção. Os epitélios produzem peptídeos, os quais possuem uma propriedade antibiótica natural. Os peptídeos mais estudados até o momento são as defensinas, as quais são abundantes nos grânulos dos neutrófilos. O epitélio do intestino secreta criptocidina, que através de mecanismos não muito conhecidos, são capazes de esterilizar localmente o lúmen das criptas intestinais. As barreiras epiteliais possuem também linfócitos T intraepiteliais, alguns linfócitos B e ainda uma população de mastócitos podem estar presentes em alguns epitélios, os quais secretam substâncias que estimulam a inflamação.

As superfícies mucosas da cavidade bucal e trato aéreo superior são importantes pontos de entrada de microrganismos envolvidos em doenças locais e sistêmicas (Geetha *et al.* 2005). Uma variedade de proteínas e peptídeos antimicrobianos têm sido identificados na saliva e fluídos das vias aéreas superiores como beta-defensina na língua (Weinbergl *et al.* 1998, Ganz *et al.* 2003), polipeptídios catiônicos (Cole *et al.* 2002), lactoferrinas, lisozima e peroxidase salivares (Tenovou, 1998, Edgerton & koshlikova, 2000). Estas proteínas têm função protetora na cavidade bucal e vias aéreas superiores. De acordo com Bradshaw (2003), a identificação de novas proteínas e peptídeos antimicrobianos é prioridade contínua. Proteína secretora da parótida (PSP) e PLUNC foram recentemente descobertas na cavidade bucal e trato aéreo superior (Bingle & Bingle, 2000). Tanto o PSP e PLUNC exibem semelhança com LPS e proteínas de ligação como BPI e LBP (Bingle & Craven, 2002).

#### Células envolvidas na imunidade inata

Como partes do sistema imune inato têm os fagócitos (neutrófilos e macrófagos), os quais têm como principais funções ingerir e destruir micróbios invasores. Os neutrófilos e macrófagos reconhecem os micróbios através de diversos receptores que funcionam para estimular a migração das células para o sítio da infecção, promover fagocitose desse agente agressor e estimular a produção de substância microbicida. Os diferentes receptores apresentam funções distintas, porém se sobrepõem. Os receptores transmembrana de sete  $\alpha$ -hélices dos fagócitos reconhecem os produtos microbianos e alguns mediadores que são produzidos em resposta à inflamação. Esses receptores transmembrana estimulam

principalmente a migração de leucócitos para o sítio de infecção. Os macrófagos usam alguns receptores para se ligar diretamente aos micróbios e fagocitá-los, por exemplo, o receptor de manose, que é uma lectina, se liga a resíduos terminais da manose e frutose das glicoproteínas e glicolípídeos presentes nas paredes dos micróbios. Os macrófagos expressam também receptores para as porções Fc dos anticorpos IgG que podem revestir os micróbios e promover a fagocitose. Essa eficiência pode ser aumentada se esses micróbios estiverem revestidos por macromoléculas chamadas de opsoninas, que podem ser reconhecidas pelo sistema de receptores dos macrófagos.

Os lipopolissacarídeos (LPS) são produtos de bactéria gram-negativa que contém componentes lipídicos e metade polissacarídea, liga-se ao receptor dos macrófagos e estimula a atividade microbicida dessas células e a secreção de citocinas. O sistema do macrófago sensível ao LPS consiste em três componentes: uma proteína plasmática chamada proteína de ligação LPS (LPB), um receptor de superfície para LPS chamado CD14 e uma subunidade receptora de transdução de sinais de mamíferos chamado receptor 4 de proteína semelhante ao “Toll”. O LPS circulante é inicialmente ligado ao LPB e depois liberado para CD14 na superfície do macrófago onde LPB é liberado. A subsequente ativação dos macrófagos é resultado de sinais desencadeados pela subunidade semelhante ao Toll, que compartilham homologia estrutural e vias de transdução de sinais com o receptor da IL tipo 1 (Abas *et al.* 2002). O reconhecimento precoce de produtos bacterianos é crítico para a sobrevivência humana. Os lipopolissacarídeos (LPS) que são constituintes das paredes de bactérias gram-negativas, ácidos lipoteicóico de bactérias gram-positivas e lipoarabinamans de micobactérias apresentam um intenso efeito crítico. Em sepse, muitos tipos celulares, incluindo neutrófilos e macrófagos, respondem a estes constituintes ativando potentes mediadores inflamatórios (Hoffmann *et al.* 1999, Bingle & Craven 2002).

Muitas moléculas associadas com a resposta inata interagem especificamente com a superfície bacteriana. Em humanos, duas proteínas são críticas na mediação de sinais de bactérias gram-negativas: proteínas ligadoras (LBP) e proteína de aumento de permeabilidade bactericida (BPI). Estas duas proteínas estão estruturalmente relacionadas e podem ser consideradas como tendo funções antagonistas. LPB aumenta a resposta celular para LPS, enquanto BPI diminui essa resposta (Bingle & Craven 2002, Bingle *et al.* 2003).

BPI é uma molécula de 55 Kd presentes nos grânulos dos leucócitos que apresenta toxicidade seletiva contra bactérias gram-negativas. É constituída por 2 domínios distintos, onde um se liga as endotoxinas bacterianas e o outro tem função de opsonina (Hoffmann *et al.* 1999, Wheeler *et al.* 2003).

Uma adequada resposta imune mediada por células tem um papel chave na resposta contra o agente da tuberculose (Branger *et al.* 2004). O reconhecimento inato dos produtos das micobactérias é o primeiro passo em uma cascata de eventos que resulta em uma efetiva defesa do hospedeiro contra a infecção pelo *M. tuberculosis*. O sistema imune inato funciona como uma barreira nas fases iniciais de infecção e também facilita uma posterior resposta imune adaptativa mediada por células T (Branger *et al.* 2004, Texereau *et al.* 2005).

As células natural killer (NK) são uma subpopulação de linfócitos que lisam as células infectadas por vírus e secretam citocinas, principalmente IFN- $\gamma$ . O principal papel fisiológico dessas células é o de defesa contra infecção por vírus e alguns outros microrganismos intracelulares. O reconhecimento das células infectadas pelas células NK é regulado por uma combinação de receptores de ativação e de inibição. Os receptores inibitórios reconhecem as moléculas de MHC de classe I (molécula de histocompatibilidade principal classe I), razão pelo qual as células NK não destroem as células normais do hospedeiro, porém matam as células nas quais a expressão de MHC classe I está reduzida, tal qual nas células infectadas por vírus. Sendo assim, as células NK são ativadas pelo reconhecimento de três tipos de células: células revestidas de anticorpos, células infectadas por vírus ou por algumas bactérias intracelulares e células com pouca expressão de moléculas de MHC. A ativação das células NK resulta no desencadeamento de funções efetoras de lise das células alvo e produção de citocinas.

Outras células que estão envolvidas na imunidade inata são as células dendríticas (DC). Essas células se originam de precursores linfóides ou mielóides na medula óssea. Apresentam importante papel durante a resposta imune inata, como reconhecimento de antígeno e na produção de citocinas, além de terem um papel de ligação entre o sistema imune inato e o adaptativo. As células dendríticas possuem dois tipos de receptores de

membrana que podem ser classificados como típicos da atividade dupla dessas células: os receptores que captam antígenos e ativam a célula (e os TLR fazem parte de tais receptores) e os produtos do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) que apresentam os antígenos captados e processados para linfócitos T (Janeway & Medzhitov 2002, Chauvin & Josen 2008). Existem pelo menos quatro subtipos de células dendríticas humanas classificadas de acordo com o tipo de citocinas produzidas *in vitro* e de marcadores de superfície expressos: 1) DC mielóides (mDC) derivadas de monócitos do sangue periférico CD14+; 2) DC dermais ou intersticiais (DDC, IDC); 3) células de Langerhans (LC); 4) DC plasmocitóides (pDC) . Existem algumas células dendríticas presentes no sangue circulante; estas são de linhagem CD11c+, CD86+, HLA-DRbright e expressam CD83 após ativação em cultura “overnight”. Essas células, no entanto, não são idênticas, pois possuem fenótipos e capacidades efetoras diferentes (Janeway & Medzhitov 2002, Chauvin & Josen 2008).

### Sistema complemento

O sistema complemento consiste de aproximadamente 20 proteínas plasmáticas que servem para ligar o reconhecimento dos micróbios às funções efetoras e ao desenvolvimento da inflamação. O reconhecimento de micróbios pelo sistema complemento na imunidade inata ocorre na via alternativa por meio do reconhecimento direto de certas estruturas de superfície microbiana, que resultará em recrutamento sequencial e reunião de proteínas adicionais do complemento em complexos de proteases. Os produtos de degradação gerados pelas proteases ligam-se covalentemente aos micróbios, podendo servir como opsoninas e promover a fagocitose dos micróbios em cuja superfície é ativada pelo complemento. Outras proteínas circulantes da imunidade inata como, por exemplo, a lectina ligadora de manose e proteína C reativa, revestem os micróbios para facilitar o reconhecimento pelo sistema complemento e fagocitose.

### Sistema imune inato durante a infecção pelo HIV

A infecção por HIV ocorre principalmente através das superfícies mucosas. Ambas as respostas imunes inata e adaptativa estão envolvidas na defesa contra a infecção pelo HIV. Embora a resposta imune inata seja fundamental nas fases iniciais da infecção pelo HIV. Os sistemas imunes inato e adaptativo possuem elementos de proteção para as mucosas, porém podem atuar de forma distinta em diferentes locais. A transmissão através da cavidade oral parece ser rara, sugerindo que o sistema imune é favorável a não infecção neste local (Moutsopoulos *et al.* 2006). Entende-se que a transmissão do HIV através das mucosas intactas depende da sobrevivência do vírus e/ou das células infectadas nas secreções mucosas, bem como do transporte por meio das barreiras epiteliais até as células alvo (Moutsopoulos *et al.* 2006). Trauma nas mucosas, inflamação e ulceração interrompem a integridade das barreiras epiteliais proporcionando acesso direto do HIV com a circulação. Epitélio escamoso, como no prepúcio, vagina, mucosa bucal, criptas tonsilares e canal anal, apresentam células que podem capturar o vírus. A mobilidade das células dendríticas pode alcançar estreitos espaços epiteliais e se estender ao limite exterior do epitélio até a proteína gp120 viral através de uma membrana de lectina tipo C (Geijtenbeek *et al.* 2000, Geijtenbeek & Kooyk 2003). Já em epitélio simples ou colunar, tais como os do intestino delgado, endocervical e reto, os espaços intra-epiteliais são fechados com as invaginações epiteliais, nestes locais células especializadas denominadas de células-M transportam o antígeno em vesículas até as barreiras epiteliais vulneráveis as células linfóides subjacentes. As células do sistema imune presentes nos locais de infecção apresentam função de proteção. Por exemplo, células T gama-delta ( $\gamma\delta$ ) estão envolvidas na proteção das mucosas pelo HIV (Wallace *et al.* 1996), enquanto que as células NK funcionam como células efetoras no início da resposta inata e pode reagir a perda da MHC classe I das células infectadas (Lehner, 2003). Células TCD8 podem ser cruciais, gerando defensinas 1, 2 e 3 que inibem a replicação do HIV (Lehner, 2003). Já células residentes como as células dendríticas, macrófagos e T gama-delta ( $\gamma\delta$ ) secretam inúmeras quimiocinas e citocinas que podem interferir na transmissão e replicação do HIV. Evidências apóiam o papel de algumas quimiocinas (RANTES, MIP1- $\alpha$  e MIP1- $\beta$ ) como inibidores da entrada do HIV, devido a sua capacidade de se ligar especificamente ao co-receptor CCR-5 do HIV, modulando a infecção (Cocchi *et al.* 1995). Embora esses estudos

ofereçam importantes informações sobre a imunopatogênese da infecção pelo HIV nas mucosas, as complexas interações entre fatores inibidores e estimuladores no microambiente *in vivo* ainda precisam ser esclarecidas (Moutsopoulos *et al.* 2006). O sistema complemento também é ativado durante a infecção pelo HIV, servindo de quimioatrativo, contribuindo para a geração da resposta imune. O sistema complemento é ativado pela via alternativa e pela via clássica levando a opsonização, embora essa via nem sempre tenha êxito, devido aos mecanismos virais existentes para escapar da opsonização (Stoiber *et al.* 2005).

O HIV pode ser detectado na saliva e no interior das glândulas salivares maiores, porém sua concentração é muito baixa nestes tecidos. Atividades anti-HIV tem sido detectada na saliva de glândulas parótidas (Fox *et al.* 1988, McNeely *et al.* 1995), submandibular e sublingual (Fox *et al.* 1988, Archibald & Cole 1990, Malamud & Friedman 1993, Nagashunmugan *et al.* 1997, Kennedy *et al.* 1998). Uma série de substâncias com conhecida atividade antimicrobiana são propostas como inibidores endógenos do HIV na saliva (Shugars & Wahl, 1998). Destes, a trombospondina (Combie *et al.* 1998) e as mucinas de alto peso molecular (Malamud & Friedman, 1993, Bergey *et al.* 1993) mostraram inibição da infecção pela formação de amplos complexos insolúveis com o vírus, enquanto o SLPI (Secretory leucocyte protease inhibitor) bloqueia mais de 90% da infectividade do HIV em concentrações endógenas (McNeely *et al.* 1995). O SLPI é uma proteína mucosa de 12 kDa, originalmente caracterizada a partir de saliva parotídea, sendo secretada por células epiteliais não ciliadas das superfícies mucosas (Franken *et al.* 1989) e por células acinares e ductais das glândulas salivares maiores (Wahl *et al.* 1997, Rocha *et al.* 2008) apresentando propriedades antiprotease, antimicrobiana e antifúngica. Rocha *et al.* (2008) analisaram a expressão de SLIP em lesões infecciosas de glândulas submandibulares de pacientes com AIDS. Os autores observaram aumento na expressão de SLIP em 9 casos de infecção pelo CMV, sugerindo papel de proteção contra infecção pelo HIV em pacientes com co-infecção pelo CMV.

Não há trabalhos mostrando a interação das proteínas PLUNC com infecções associadas ao HIV até o presente momento na literatura científica.

## 2.11. PLUNC

### Descrição de PLUNC

O gene “Palate, lung and nasal epithelium clone (PLUNC)”, foi descrito primeiramente por Weston *et al.* (1999) no epitélio embriológico do palato e fossas nasais de ratos e no epitélio traqueobrônquico do pulmão de camundongos adultos durante estudo para identificar genes com possíveis papéis na regulação do desenvolvimento facial. Weston *et al.* (1999) tentando identificar genes com possíveis papéis na regulação do desenvolvimento facial, acabaram descobrindo esse novo gene expresso pelo epitélio do palato, pulmão e fossas nasais de camundongos com aproximadamente PLUNC possui aproximadamente 1.1 “kilobases” (Kb) de comprimento e codifica uma proteína de aproximadamente 300k, denominada pelos autores de PLUNC (palate, lung and nasal epithelium clone).

Bingle & Bingle em 2000 caracterizaram o gene PLUNC humano que contém 1020 pb e está localizado no cromossomo 2q11, contém 9 éxons com aproximadamente 7.3 Kb. O primeiro (menor) e o nono éxons não são traduzidos. Uma suposta TATAbox está localizada a 40 pares de base (pb) do fim do primeiro éxon. Os éxons variam de tamanho entre 40 a 174 bp, enquanto que os íntrons variam entre 1642 e 159 bp. Um longo íntron separa o primeiro e o segundo éxon. Segundo os autores, o gene PLUNC humano apresenta 72% de similaridade com o gene PLUNC dos roedores.

Vários estudos demonstraram homologia de PLUNC em células de epitélio normal da cavidade nasal e vias aéreas superiores de ratos, vaca, porco, camundongo e humanos (Bingle & Bingle 2000, LeClair *et al.* 2001, Sung *et al.* 2002, LeClair, 2003, Larsen *et al.* 2005).

LeClair *et al.* (2004) caracterizaram a seqüência genômica e expressão de SPLUNC 5 em camundongo, no qual apresentou 60% de homologia com SPLUNC 1 de camundongos, no entanto, SPLUNC 5 é expresso exclusivamente no epitélio intrapapilar da superfície dorsal da língua. Esse padrão de expressão é consistente com a hipótese de que estas proteínas protegem as superfícies epiteliais colonizadas por microrganismos potencialmente patogênicos. De acordo com Bingle & Craven (2003), há aproximadamente 45-76% de homologia entre os genes de PLUNC humano e de camundongo.

### Membros da Família PLUNC

A família PLUNC é constituída por dez proteínas que se dividem em dois grupos: um grupo designado como proteínas curtas, contendo oito ou nove éxons, compreendendo a SPLUNC1 (256 aminoácidos), SPLUNC2 (249 aminoácidos) e SPLUNC3 (253 aminoácidos); e outro grupo designado como proteínas longas, contendo quinze ou dezesseis éxons, compreendendo LPLUNC1 (484 aminoácidos), LPLUNC2 (458 aminoácidos), LPLUNC3 (463 aminoácidos) e LPLUNC4(> 469 aminoácidos) (Bingle e Bingle, 2000; Bingle & Craven 2002; LeCleir 2003, Bingle *et al.* 2003). Recentemente Bingle e Craven (2003) afirmaram que a família de proteínas PLUNC é formada por quatro pequenos genes e por 6 genes longos. LPLUNC 5 não está totalmente identificado, sendo sugerido que ele possa ser um pseudogene. Dois LPUNC foram recentemente descritos como BPIL1 e BPIL3. O gene SPLUNC tem recebido a designação de “BASE (breast cancer and salivary expressed)”. Esse gene parece ter organização genômica semelhante a outros genes SPLUNCs, porém BASE parece ter uma modificação entre a junção do sexto e sétimo éxons, resultando na perda da cisteína, sugerindo uma modificação genética recente.

### Função de PLUNC

A função de PLUNC ainda é incerta, porém devido à superexpressão de PLUNC em epitélios expostos a injúrias, pode ser sugerido que essas proteínas são secretadas como produtos com papel defensivo ou protetor (Bingle & Craven, 2003).

Algumas hipóteses foram sugeridas para a função de PLUNC no sistema imune inato do epitélio oral e das vias aéreas superiores por Bingle & Craven (2002) e LeClair (2003). Segundo estes autores as proteínas da família PLUNC, assim como outras moléculas de imunidade inata (BPI, LBP), possuem potenciais receptores de lipopolissacarídeos (LPS), sendo assim, as proteínas LPLUNC podem atuar de modo similar a LBP, tendo uma função pró-inflamatória (Bingle & Craven 2004) apresentando moléculas microbianas à via CD14/receptores toll-like (TLR) 2 ou TLR-4, envolvendo outras vias de TLRs ou ainda sinalizando outras vias desconhecidas. Em contrapartida, a SPLUNC agiria de forma similar a BPI, tendo uma função antiinflamatória, diminuindo a

carga microbiana através da morte celular direta ou do seqüestro de moléculas inflamatórias.

As proteínas SPLUNCs apresentam homologia com o domínio N-terminal da proteína BPI, enquanto que as proteínas LPLUNC apresentam homologia com os domínios N-terminal e C-terminal do BPI (Bingle & Craven 2003).

### Expressão de PLUNC

A expressão da proteína PLUNC foi avaliada por diferentes autores e em diferentes sítios. Kim *et al.* (2006) demonstraram que PLUNC é secretado por células do epitélio nasal e não são influenciados pela diferenciação mucociliar ou por mediadores pré-inflamatórios. Através de reações de imunoistoquímica e western blot, os autores mostraram que a proteína PLUNC foi expressa na superfície de células ciliadas epiteliais e nas células serosas da glândula submucosa da mucosa nasal humana e nas secreções nasal de pessoas saudáveis.

LeClair *et al.* (2004) analisaram os genomas de humanos, ratos e camundongos buscando relações entre a família de proteínas PLUNC de humanos e outras espécies e membros da família BPI. SPLUNC 1 é expresso em células do epitélio normal da cavidade nasal e trato aéreo superior de camundongos (Weston *et al.* 1999). SPLUNC é um gene ortólogo, ou seja, gene semelhante em diferentes espécies. SPLUNC 1 é expresso em humanos (Bingle & Bingle 2000), ratos (Sung *et al.* 2002), vacas (Wheeler *et al.* 2002) e porcos (Larsen *et al.* 2005), sendo também expresso em células do epitélio normal da cavidade nasal e trato aéreo superior. SPLUNC 1 também tem sido detectado em lavados nasal e brônquico (Sung *et al.* 2002, Ghafouri *et al.* 2003, Cole *et al.* 2002). A expressão de SPLUNC 1 parece aumentado em casos de cirurgia invasiva (Sung *et al.* 2002) e irritação no trato aéreo superior (Gafouri *et al.* 2002, Lindahe *et al.* 2001) e em doenças pulmonares (Di *et al.* 2003). SPLUNC 5 é expresso apenas no epitélio de língua de camundongos e ratos e não em humanos e LPLUNC 1 foi encontrada em células serosas das glândulas de Von Ebner's, palato, faringe anterior, traquéia e brônquios. Bingle & Craven (2002) também observaram a expressão de SLUNC 2 e LPLUNC 2 em glândulas submandibulares. Bingle *et al.* (2005) identificaram a expressão de SPLUNC 1 em

glândulas submucosas do trato aéreo superior, glândulas mucosas da orofaringe, mucosa de seio maxilar e em diferentes cânceres de pulmão, sugerindo que a expressão de SPLUNC 1 está associada com tumores que apresentam fenótipo secretor.

Recentemente, Zhou *et al.* (2006) avaliaram a expressão do SPLUNC1 em quatro fetos humanos normais por imunohistoquímica e RT-PCR. Os autores avaliaram o trato respiratório superior, glândulas salivares, trato digestivo, olhos e tecido adiposo. A glândula parótida apresentou uma forte marcação para SPLUNC1 enquanto que a glândula submandibular apresentou uma marcação fraca. O estudo mostrou que a expressão de SPLUNC1 ocorre com maior intensidade em fetos humanos do que em adultos. Os autores indicam que SPLUNC1 não está somente envolvida nos mecanismos de defesa do trato respiratório superior, olhos, e trato digestivo, mas provavelmente também esteja envolvido no desenvolvimento do feto e do metabolismo lipídico.

A expressão de PLUNC também foi observada em tecido glandular do trato respiratório por Bingle *et al.* (2005). Eles demonstraram também que SPLUNC 1 pode ser encontrado em células mucosas, em ductos de glândulas submucosas, glândulas menores do nariz, seios paranasais, região posterior da língua e tonsila.

Chu *et al.* (2007) determinaram as funções antiinflamatórias e de defesa da proteína SPLUNC1 na infecção respiratória por *Mycoplasma pneumoniae* (MP) e a regulação de SPLUNC1 pelo MP e na inflamação alérgica. Os resultados demonstraram que a proteína SPLUNC1 diminuiu os níveis de infecção pelo MP e inibiu a produção epitelial de IL-8 induzida pelo MP; muitas células epiteliais respiratórias de humanos e ratos mostraram um alto nível de expressão de SPLUNC1; foi observado também que a infecção pelo MP aumenta a expressão de SPLUNC1 e diminui a expressão de IL-13. Dessa forma, sugere-se que SPLUNC 1 serve como uma nova proteína de defesa do hospedeiro contra o MP e que uma reação alérgica pode reduzir acentuadamente a expressão de SPLUNC 1, o que pode contribuir em parte para a natureza persistente de infecções bacterianas nas vias respiratórias alérgicas.

A proteína PLUNC foi identificada pela primeira vez na saliva humana por Vitorino *et al.* (2004) utilizando a técnica proteômica. Das proteínas avaliadas pelos autores, 11 foram separadas e identificadas na saliva pela primeira vez utilizando as ferramentas

proteômicas. Além disso, as proteínas PLUNC, cistatina A e cistatina B foram pioneiramente identificadas na saliva.

He *et al.* (2005) investigaram a possível associação entre o polimorfismo do gene PLUNC com a suscetibilidade ao carcinoma nasofaríngeo em 239 pacientes com carcinoma e em 286 controles, e concluíram que a variação genética no PLUNC pode influenciar a suscetibilidade ao carcinoma nasofaríngeo na população estudada. Vargas *et al.* (2008) determinaram a expressão das proteínas PLUNC em tumores benignos e malignos de glândula salivares (n= 64) usando a técnica de imunoistoquímica para SPLUNC1, SPLUNC2 e LPLUNC1. Os autores identificaram a expressão de PLUNC somente nos carcinomas mucoepidermóides e cistoadenocarcinoma papilar, todos os outros tumores avaliados incluindo carcinoma adenóide cístico, carcinoma ex-adenoma pleomórfico, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau, adenoma pleomórfico, carcinoma de células acinares e carcinoma mioepitelial foram negativos. “Plugs” de mucina, células mucosas e células intermediárias do carcinoma mucoepidermóide foram positivas para LPLUNC1 e SPLUNC2, mas áreas compostas de células claras e epidermóides foram negativas para todos os subtipos de PLUNC estudados. O cistoadenocarcinoma papilar foi positivo para todos os subtipos de PLUNC estudados. Segundo os autores a expressão intensa de duas proteínas PLUNC em células mucosas e “plugs” de mucina no carcinoma mucoepidermóide e no cistoadenocarcinoma papilar indicam que elas podem ser utilizadas como ferramenta diagnóstica complementar em casos com dificuldade diagnóstica.

Bingle *et al.* (2007) avaliaram as diferentes expressões de SPLUNC 1 em casos de fibrose cística através de imunoistoquímica para SPLUNC 1 e outros marcadores para células inflamatórias e cultura de células para SPUNC 1. Foi observado aumento significativamente da expressão de SPLUNC 1 nos casos de fibrose cística, quando comparada com áreas sem fibrose cística. Através de RT-PCR os autores também mostraram que mediadores pró-inflamatórios não induziram a expressão de SPLUNC 1.

Bartlett *et al.* (2008) foram os primeiros autores a apresentar indícios da presença de PLUNC em células de linhagem hematopoiética. Através de western blot, os autores demonstraram a presença de PLUNC nos grânulos específicos dos neutrófilos que são secretados após a degranulação, indicando que a liberação de PLUNC pelos polimorfos

nucleares atua na resposta do estímulo inflamatório. Estes resultados sugerem que a secreção de PLUNC está fortemente vinculada à degranulação e é provável que seja uma característica geral da ativação neutrofílica em resposta a uma variedade de estímulos. Os autores também testaram a capacidade antibacteriana da PLUNC em bactérias como a *E. coli* DH5- $\alpha$ , *Pseudomonas aeruginosa* e na bactéria Gram positiva *Listeria monocytogenes*. Após a incubação destas bactérias com a proteína PLUNC, não houve qualquer efeito aparente na sobrevivência bacteriana. Esses resultados levaram os autores a concluir que a PLUNC por si só não é um agente antimicrobiano eficaz contra este grupo de microorganismos.

Não existem estudos sobre a expressão de PLUNC em glândulas salivares maiores de paciente com AIDS em fase avançada.

### **3. PROPOSIÇÃO**

#### **Objetivo geral**

Analisar a expressão das proteínas da família PLUNC nas glândulas salivares maiores de pacientes HIV negativos e pacientes autopsiados com AIDS em fase avançada.

#### **Objetivos específicos**

1. Analisar o padrão imunistoquímico das proteínas da família PLUNC nas glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais de pacientes HIV soronegativos (grupo controle).
2. Analisar o padrão de marcação dos anticorpos da família PLUNC nas glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais com ou sem lesões infecciosas de pacientes autopsiados com AIDS avançada.
3. Comparar o padrão de marcação dos anticorpos da família PLUNC entre o grupo controle e grupo de pacientes com AIDS avançada.
4. Comparar o padrão de marcação dos anticorpos da família PLUNC nas áreas da lesão infecciosa e na periferia da lesão.
5. Analisar a expressão da proteína PLUNC e do RNA mensageiro no grupo controle por meio de hibridização *in situ*.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

O Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP/UNICAMP) aprovou a realização do presente estudo (Protocolo n. 155/2006).

### **4.1. Casuística**

Foram usados neste trabalho os blocos de parafina correspondentes às glândulas salivares parótidas (n=35), submandibulares (n=37) e sublinguais (n=27) de pacientes autopsiados com AIDS em fase avançada entre 1996 e 1999 no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), e 10 pacientes HIV negativos (grupo controle) que foram a óbito por outras doenças.

### **4.2. Autópsia nos casos de AIDS**

A dissecação das autópsias, realizadas previamente por Vargas *et al.* (2003), seguiram as normas do Serviço de Verificação de Óbito da Capital (SVOC) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

### **4.3. Coleta dos dados clínicos e das autópsias**

Os dados clínicos (idade, gênero, contagem de células TCD4 e TCD8 e complicações relacionadas com as glândulas salivares) foram obtidos dos prontuários hospitalares do HC-FMUSP e os achados da autópsia da Folha Frontal Padrão do Departamento de Patologia da FMUSP. Não utilizamos as informações referentes aos medicamentos antiretrovirais ingeridos pelos pacientes com AIDS, visto que estas informações estavam incompletas ou ausentes na maioria dos prontuários analisados.

### **4.4. Processamento e análise histológica**

Todas as glândulas foram fixadas em formol neutro tamponado a 10% por 24 horas sendo posteriormente feitos 6 cortes transversais ao longo do maior eixo e incluídos em parafina. Cortes histológicos de 5µm de espessura foram corados com Hematoxilina &

Eosina (H&E), Mucicarmim, Grocott, e Ziehl-Neelsen (ZN) para BAAR (bacilos álcoolácido resistentes). A análise histológica de todos os casos usados nesta pesquisa foi realizada previamente por Vargas *et al.* (2003) e León *et al.* (2008).

Os pacientes autopsiados foram divididos em 05 grupos para a análise da expressão de PLUNC nas glândulas salivares maiores: grupo 01- controle (pacientes HIV negativos), grupo 02- HIV+ sem alterações nas glândulas salivares maiores, grupo 03- (micobacteriose), grupo 04 (citomegalovirose) e grupo 05 (sialadenite). Nos grupos 03 e 04 foram analisadas duas regiões diferentes, sendo áreas ao redor do granuloma ou parênquima glandular onde o bacilo da tuberculose ou foi evidenciado previamente, assim como as áreas de infecção pelo CMV e área na periferia da lesão com uma distância de um aumento de 200x.

#### **4.5. Reações de Imunoistoquímica**

As reações para avaliar o padrão de expressão da família PLUNC nas glândulas salivares maiores de pacientes autopsiados com AIDS em fase avançada foram efetuadas no Departamento de Patologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade de Sheffield (Reino Unido) sob supervisão da Dra. Lynne Bingle. Os seguintes anticorpos foram utilizados: SPLUNC 1 (diluição 1:300), SPLUNC 2A (diluição 1:250), SPLUNC 2B (diluição 1:500) e LPLUNC 1B (diluição 1:600). Estes anticorpos não são comerciais e foram gentilmente doados para essa pesquisa pela Dra. Lynne Bingle. Os anticorpos foram gerados através da injeção de peptídeos sintéticos em coelhos. Para SPLUNC 2, a seqüência de peptídeos corresponde aos aminoácidos 236-249-COOH (VDNPQHKTQLQTLI) que representa a extremidade da região C-terminal da proteína. Para LPLUNC 1 a seqüência de peptídeo corresponde aos aminoácidos 139-154 (TIRMDTSASGPTRLV) o qual está localizado no primeiro domínio para BPI.

O seguinte protocolo foi utilizado: inicialmente foram obtidos cortes parafinados de 3µm de espessura, montados em lâminas silanizadas em todos os casos selecionados. Em seguida foi realizada a primeira desparafinização em xilol por 5 minutos, segunda desparafinização em xilol por 5 minutos. A próxima etapa consistiu em duas hidratações

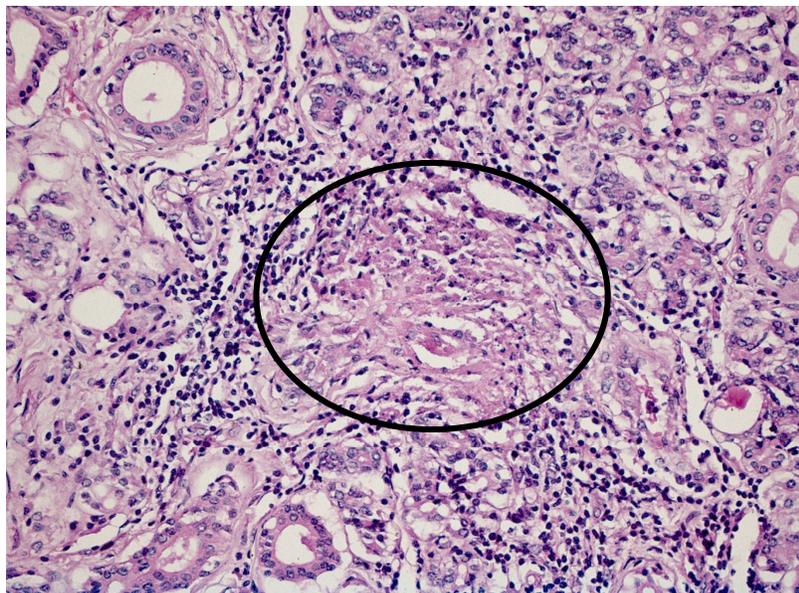
dos cortes em etanol absoluto e álcool 70% por 5 minutos cada, seguida por lavagens em água corrente e destilada. Foi então, realizado o bloqueio da peroxidase endógena, em água oxigenada (3% em metanol) por 20 minutos, e lavado rapidamente em PBS (Tampão fosfato salino).

A recuperação antigênica, quando necessária, foi realizada pela fervura em microondas, com solução de citrato de sódio (tribásico) 0,01M por 8 minutos, deixando esfriar até atingir a temperatura ambiente seguida por lavagem em PBS. Posteriormente, foi realizado um bloqueio de proteínas com 100% de soro fetal de cabra (Sigma Aldrich), em câmara úmida por 30 minutos em temperatura ambiente. Então, foi efetuada a incubação por 18 horas a 4°C com o anticorpo primário diluído em soro fetal de cabra, o qual foi diluído de acordo com as especificações citadas acima. Um controle negativo utilizando anticorpo IgG (Dako Cytomation) foi utilizado em cada caso. As lâminas foram lavadas 2 vezes em PBS sob agitação por 5 minutos cada e então incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (Vectastain Elite ABC kit, Rabbit/Vector Laboratories) por 30 minutos em temperatura ambiente, seguido de 2 lavagens em PBS sob agitação por 5 minutos cada. Após isso, as lâminas foram incubadas com complexo Avidina – Biotina (Vectastain Elite ABC kit, Rabbit/Vector Laboratories) por mais 30 minutos em temperatura ambiente. Foi feita então uma nova lavagem com PBS com duas trocas de 5 minutos sob agitação. Na próxima etapa as lâminas foram reveladas com o substrato cromógeno para peroxidase (Vector NovaRed, Substrate kit for peroxidase) por 2 a 5 minutos ou até o aparecimento de cor em temperatura ambiente e lavadas em água destilada por 5 minutos. As lâminas foram então contra-coradas com Hematoxilina e lavadas em água corrente e água destilada. Os cortes foram desidratados em banhos de álcool 70%, 90% e absoluto seguido pela diafanização em xilol e montagem das lâminas com resina de baixa viscosidade.

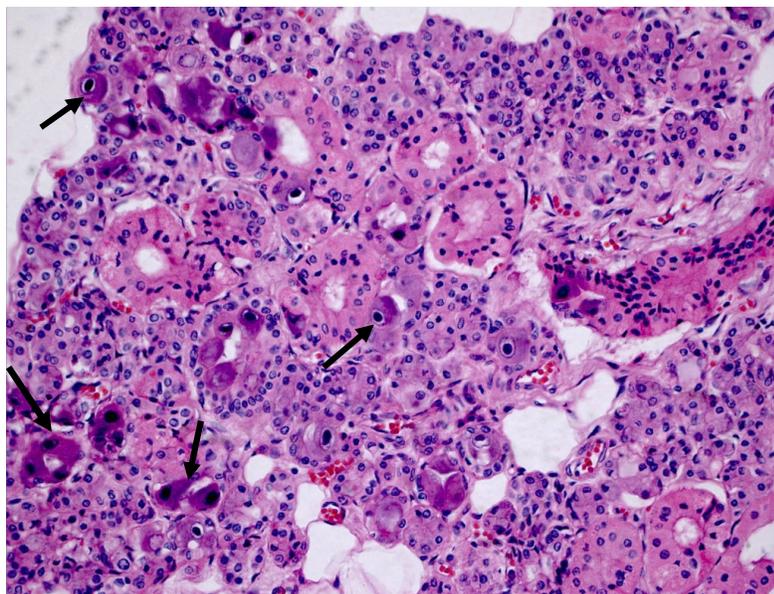
#### Avaliação da marcação imunoistoquímica

As reações foram avaliadas como positivas ou negativas. A imunoreatividade para os anticorpos SPLUNC 1, SLPUNC 2A, SPLUNC 2B, LPLUNC1 nas glândulas salivares maiores foram quantificadas através de análise da área corada e da intensidade de marcação

citoplasmática (fraca, moderada ou intensa) usando o programa Image Pro-Plus versão 4.5. Foram selecionados 10 campos de cada caso. Nós analisamos a intensidade da área corada mediante a prévia padronização com o software e analisamos também a relação da área total e área corada, sendo assim, o valor da área total foi dividida pela área corada. A figura 01 mostra um caso de infecção pelo MTB para ilustrar a áreas em volta da lesão. O círculo mostra área de necrose, foi considerada área em volta da lesão todos os ácinos presente no campo da imagem. A figura 02 mostra a área de lesão de caso de infecção pelo CMV. As setas mostram a infecção pelo vírus. Nós consideramos área em volta da lesão os ácinos que estão permeando a infecção.



**Figura 01.** Micobacteriose em glândula submandibular, mostrando área de necrose (círculo), os ácinos que circundam a área de necrose foram classificados como área de lesão. (Hematoxilina & Eosina 200x)



**Figura 02.** Citomegalovirose em glândula submandibular, mostrando área de infecção (setas), os ácinos que circundam a área de infecção pelo CMV foram classificados como área de lesão. (Hematoxilina & Eosina 200x)

#### **4.6. Construção da Sonda de RNA para hibridização *in situ***

A sonda para SPLUNC 2 foi construída no Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de Sheffield, Reino Unido, durante o estágio de 2 meses desenvolvidos pela Dra Andréia Ap. Silva nesse Departamento no ano de 2008.

##### **4.6.1. Amplificação do cDNA por PCR**

O produto de reação de Transcriptase reversa (RT) proveniente de RNA extraído de glândula submandibular usado como “template” para amplificação por meio de Reação em cadeia da polimerase (PCR). Foi utilizado um conjunto de “primers” para a detecção de SPLUNC 2. A seqüência do “primer sense” foi: AACTGATCCCCAGACACACC, enquanto que a seqüência do “primer antisense” foi GACAATGGGCCTTTATTGC. Foram realizadas reações de PCR de 25µl, contendo 5µl de 10X PCR “buffer”, 2µl de 25mM cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), 1µl de 10mM de dntp mix (dTAP, dCTP, dGTP, dTTP), 1µl de cada “primer”, 1µl “template” DNA de SPLUNC 2 e 0,2µl de Taq DNA polimerase

(Promega Corporation, USA). Água RNA “free” foi utilizada para completar o volume total de 25µl. As condições de PCR para a amplificação de SPLUNC 2 foram: 29 ciclos de 95°C por 1 minuto, 60°C por 2 minutos, 72°C por 3 minutos e extensão final a 72 °C por 30 minutos. Uma alíquota de 25 µl de produto de PCR foi separada eletroforéticamente em gel de agarose 1,5% e corada por brometo de etídeo em “TAE buffer” junto com marcadores de DNA.

#### **4.6.2. Extração de DNA em gel de agarose**

Para a extração de DNA foi utilizado kit QIAquick (Qiagen) e seguiram as normas do fabricante. As bandas do gel foram cortadas e adicionadas em um tubo de plástico. Cada amostra foi pesada e adicionada 3x o volume das amostras do “buffer” QG. A amostra foi incubada a 50°C por 10 minutos ou até que o pedaço de gel tivesse sido completamente dissolvido. Após totalmente dissolvido, foi adicionado 1x do volume do gel de isopropanol (Sigma - Aldrich) e misturado. 700 µl foi aplicado na coluna Qiaquick e então centrifugada por 1 minuto a 13000 rpm a temperatura ambiente. O fluxo foi descartado e repetido esse passo até que todo o conteúdo tenha sido centrifugado. Para a lavagem da membrana de sílica da coluna, foi adicionado 750 µl do “buffer PE” e centrifugado por 1 minuto a 13000 rpm em temperatura ambiente, o fluxo de baixo foi descartado. A coluna foi transferida para um “ependorf” limpo e então o DNA foi eluído adicionando 50µl de água e centrifugado por mais um minuto a 13000 rpm.

#### **4.6.3. Clonagem**

O produto de extração foi ligado com pCR<sup>TM</sup>II vector (Invitrogen, USA) seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen, USA). Em um tubo de plástico foram adicionados 2µl do produto de extração de gel de agarose, 1µl de NaCl, 2 µl de água “RNA free” e 1µl vetor pCR<sup>TM</sup>II vector. A reação foi levemente misturada e incubada em temperatura ambiente por 5 minutos.

#### **4.6.4. Transformação**

A reação de clonagem foi transformada usando células quimicamente competentes do kit One Shot TOP 10 (Invitrogen, com as instruções do fabricante. No mesmo tudo de

plástico da transformação foram adicionadas 18µl de células competentes TOP 10 (Invitrogen, USA) e colocada em gelo por 30 minutos. Após os 30 minutos, foi realizado choque térmico a 42°C por 30 segundos e novamente o tubo foi colocado no gelo. 100µl de meio de cultura SOC foi adicionado e as células foram crescidas por 1 hora sob agitação por 1 hora (150 rpm). Placas de petri com LB Agar (Luria Bertani agar, Sigma-Aldrich) autoclavadas foram preparados com 100 µg/ml de ampicilina e 40µg/ml de X-gal. Essas placas foram pré-aquecidas a 37°C e então 100µl das células transformadas foram espalhadas em placas e colocada em incubadora a 37°C overnight.

#### **4.6.5. Isolamento do DNA Plasmidial (mini-prep)**

Apenas uma colônia foi separada e colocada novamente para crescer em 2 ml de LB broth (Luria Bertani broth, Sigma Aldrich) juntamente com 2 µl (100 µg/ml) de ampicilina a 37°C , “overnight”. 1,5 ml da suspensão celular foram usadas para isolamento do DNA plasmidial, o restante foi guardado a 4°C. Para esse procedimento foi utilizado Kit QIAprep Spin miniprep (QIAGEN) e seguidas as recomendações do fabricante. A suspensão celular foi centrifugada por 3 minutos a 13000 rpm a temperatura ambiente e o sobrenadante desprezado. 250 µl do “buffer P01” foi adicionado para ressuspender o “pellet”. Então 250µl do “buffer P02” foi adicionado e gentilmente misturado com as mãos. 350 µl do “buffer N03” foi adicionado e novamente gentilmente invertendo o tubo de 4 a 6 vezes. A suspensão foi então centrifugada por 10 minutos a 13000 rpm a temperatura ambiente. O sobrenadante foi então transferido para uma coluna própria do kit e centrifugado por 1 minuto a 13000 rpm em temperatura ambiente. O fluxo foi descartado. 500 µl de “buffer PB” foi adicionado e centrifugado por 1 minuto a 13000 rpm a temperatura ambiente, o fluxo despejado no tubo foi novamente descartado. Foram então adicionados 750 µl do “buffer PE” e centrifugada por 1 minuto a temperatura ambiente. O fluxo foi descartado e novamente centrifugado por mais 1 minuto. A coluna do kit foi colocada em um tubo limpo. O DNA plasmidial foi então ressuspendido em 50µl de água e centrifugado por 1 minuto a 13000 rpm a temperatura ambiente. Para checar a inserção do DNA plasmidial isolado, foi realizada digestão com enzima de restrição ECO-R1 (Promega Corporation) para isso foi utilizado 8µl do DNA plasmidial junto com 1µl da enzima e 1µl de buffer para

enzima de restrição ECO-R1, incubada a 37°C “overnight”. Gel de agarose a 1,5% foi realizado para checar a ação da enzima. A amostra foi então enviada para seqüenciamento do DNA através do método automático com máquina da Applied Biosystems (ABI 3730). O seqüenciamento foi então checado no GeneBank com o programa BLAST.

#### **4.6.6. Preparação de DNA Maxi plasmídeos**

Maxi plasmídeos foram realizados utilizando kit Plasmid Max Kit (Qiagem) de acordo com as recomendações do fabricante. 50µl da suspensão celular foram novamente crescidas em 100 ml de “LB broth” (Sigma Aldrich) e 100µl de ampicilina a 37°C “overnight” sob agitação. As células foram centrifugadas a 6200 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuscitado em 10 ml do “buffer P01”. 10 ml do “buffer P02” foi adicionado, misturado gentilmente com as mãos, invertendo o tubo de 4 a 6 vezes e então incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. 10 ml do “buffer P03” (pré-resfriado) foi adicionado e novamente gentilmente agitado com as mãos invertendo o tubo por 4 a 6 vezes e então incubado em gelo por 20 minutos. A suspensão foi transferido para tubo de 50 ml e centrifugada por 30 minutos a 12000 rpm a 4°C. o sobrenadante foi aplicado em QIAGEN-tip 500 (pré-lavadas com 10 ml de “buffer QBT”) passando através da gravidade pelo “tip”. O “tip” foi lavado 2 vezes com 30 ml de “buffer QC”. O DNA foi então eluído com 15 ml de “buffer QF” e precipitado com 10,5 ml de isopropanol (Sigma-Aldrich) e centrifugado por 30 minutos a 12000 rpm a 4°C. o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o pellet lavado com 5 ml de álcool 70% e seco em temperatura ambiente. Finalmente o DNA foi ressuscitado em 200µl de água RNA-“free.”

#### **4.6.7. Linearização do DNA Plasmidial**

De acordo com o vetor usado na clonagem, enzimas de restrição foram utilizadas para linearizar os plasmídeos nesse estudo. Dez microgramas de DNA plasmidial foram digeridos com duas diferentes enzimas de restrição selecionadas e mostradas na tabela 01. As reações de digestão foram realizadas a 37°C “overnight” para uma perfeita linearização. Gel de DNA foi realizado para confirmar a linearização.

**Tabela 01.** Enzimas de restrição utilizadas durante a linearização do plasmídeo

Nome	Vetor	Orientação	Enzimas de restrição	
		5'→3'	Sense	Antisense
SPLUNC 2	pCRII	SP6 → T7	Hind III	Xho I

#### 4.6.8. Síntese de sondas digoxigenina para SPLUNC

A síntese das sondas foi realizada usando “DIG RNA Labelling Kit” (Roche Science), de acordo com as instruções do fabricante. Tomou-se o cuidado de manter o ambiente limpo, sendo a bancada limpa com álcool 70% e uso de tubos RNA free. Os reagentes foram então adicionados em microtubo RNA “free”: 2µl de buffer de transcrição, 1µg de DNA plasmidial linearizado (para sense e antisense), 2µl de NTP labelling mix (10 mM ATP, 10 mM GTP, 10 mM UTP, 10 mM CTP), 2µl de RNA polimerase (RNA polimerase T7 utilizada para Hind III e RNA polimerase SP6 para XhoI), 9µl de água RNA free. Após rápida centrifugação, o microtubo foi incubado a 37°C por 2 horas para a transcrição. Então 2µl de inibidor de RNase foi adicionado e incubado por mais 15 minutos a 37°C por 15 minutos. Para parar a reação foi adicionado 2µl de 0.2 M de EDTA (pH8). Após o término da reação de transcrição, foi realizado gel de 1,5 % de agarose para RNA para checar a transcrição.

#### 4.6.9. Técnica de Hibridização *in situ*

##### Desparafinização e hidratação dos cortes:

Os cortes foram desparafinizados com xilol 3 vezes de 15 minutos cada e hidratados com álcool 99%, 95% e 75% (2 minutos em cada concentração). Então os cortes hidratados foram lavados 2 vezes em água corrente, 2 vezes em água destilada autoclavada (2 minutos cada) e então lavada 2 vezes em PBS (5 minutos e 10 minutos respectivamente).

##### Digestão proteolítica e fixação pós-digestão:

Para permeabilizar os cortes usados para hibridização, foi realizada digestão de proteínas com 250µg/ml de Proteinase K (Sigma-Aldrich) em PBS a 37°C por 35 minutos. Após a digestão, os cortes foram lavados 2 vezes em PBS por 5 minutos cada sob agitação e então fixados com paraformaldeído a 4% em PBS por 5 minutos. Os cortes fixados foram então lavados 2 vezes em PBS por 5 minutos cada sob agitação e depois desidratados em álcool 75%, 95% e 99%. Os cortes foram secados em temperatura ambiente para posterior hibridização.

#### Hibridização:

Para reduzir o “background”, os cortes foram pré-hibridizados com solução de hibridização (Sigma-Aldrich). Então 50µl de solução de hibridização sem a sonda foram aplicadas em cada corte, coberto com lamínula e aplicada na máquina de hibridização a 60°C por 30 minutos. Então 50µl de sonda “sense” usada como controle negativo, ou “antisense” (diluída na solução de hibridização) e coberta com lamínula. A hibridização foi realizada de acordo com as condições a seguir: os cortes foram aquecidos até 90°C por 2 minutos e então reduzida para anelamento a temperatura de 60°C por 18 horas.

#### Lavagem pós hibridização e desenvolvimento de cor:

As lâminas foram incubadas em 2xSSC (“Sodium Chloride Citrate”) a temperatura ambiente até que as lamínulas se soltassem. Após as lâminas incubadas novamente em 2xSSC a temperatura ambiente por outros 30 minutos, as lâminas foram incubadas 2 vezes em formamida 25% em 2xSSC a 45°C por 30 minutos e uma vez em 2xSSC a 45°C por 30 minutos. O kit DIG nucleic acid detection kit (Roche Science) foi usado para detectar o sinal do RNA mensageiro. As lâminas foram lavadas em PBT (Tween 20 a 1% em PBS) e então incubada 2 vezes em PBT por 10 minutos cada em temperatura ambiente. As lâminas foram colocadas em câmara úmida e incubadas com solução de bloqueio (soro de carneiro a 2%, 2 mg/ml de BSA em PBT) por 30 minutos. A solução de bloqueio foi substituída com solução de bloqueio contendo anticorpo anti-DIG conjugado com fosfatase alcalina na diluição de 1:2500 e então incubado por 30 minutos a temperatura ambiente. Então as lâminas foram lavadas foram lavadas por 5 vezes com PBT (10 minutos cada, sob agitação)

e então equilibrado com buffer de detecção (0.1 M Tris, pH 9,5; 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 M NaCl, 0.1% de Tween 20) por 2 vezes (10 minutos cada). Então 200µl NBT/BCIP (Nitroblue tetrazolim – 5-bromo-4 chloro- 3 indolylphospate) foi diluindo em 10 ml de buffer de detecção. 200µl dessa solução foi aplicado em cada lâmina, colocado em câmara úmida e escura por 16 horas para o desenvolvimento de cor. As lâminas foram então lavadas duas vezes em água destilada por 10 minutos cada e contracoradas com Núcleo “fast red” e montadas em meio aquoso.

#### **4.7. Análise estatística**

Avaliação estatística dos dados utilizou métodos paramétricos e não-paramétricos como Kruskal-Wallis, Mann-Whitney, teste T e o teste Anova para a comparação entre os grupos. Foi utilizado o software SPSS versão 13.0. O teste será considerado estatisticamente significativo quando o p for < ou igual a 0.05.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Grupo Controle (HIV negativo)**

As tabelas 02 (parótida), 03 (submandibular) e 04 (sublingual) apresentam os dados dos pacientes HIV soronegativos autopsiados com relação ao sexo, idade, causa morte e principais achados na folha frontal padrão.

Dos 14 casos selecionados para o grupo controle, 10 (71,42%) corresponderam ao gênero masculino, e 4 (28,57%) ao gênero feminino. A idade variou de 45 a 70 anos, com idade média de 60,92 anos  $\pm$  9,48 anos, sendo que em duas autópsias a idade não era conhecida. A idade mínima foi de 45 anos e a idade máxima 77 anos. Em 03 casos as três glândulas salivares maiores pertenceram aos mesmos pacientes (casos 01, 02 e 10). Todos pacientes não apresentaram aumento de volume ou suspeita médica de doença prévia nas glândulas salivares maiores. Microscopicamente, em apenas dois casos (casos 02 e 05) foi observado discreto infiltrado inflamatório crônico. Não ocorreram neoplasias, cistos ou infecções em nenhum dos 14 casos.

### **5.2. Grupo de pacientes autopsiados com AIDS.**

As tabelas 05 (parótida), 06 (submandibular) e 07 (sublingual) mostram os dados dos 63 pacientes com AIDS em relação ao sexo, idade, causa morte e principais achados da Folha Frontal Padrão. Das 63 autópsias selecionadas para esse estudo, 43 (68,25%) ocorreram em pacientes do gênero masculino e 20 (31,75%) no gênero feminino. A média de idade dos pacientes autopsiados foi de 37,75 anos  $\pm$  11,11 anos. A idade mínima foi de 15 anos e a idade máxima 69 anos.

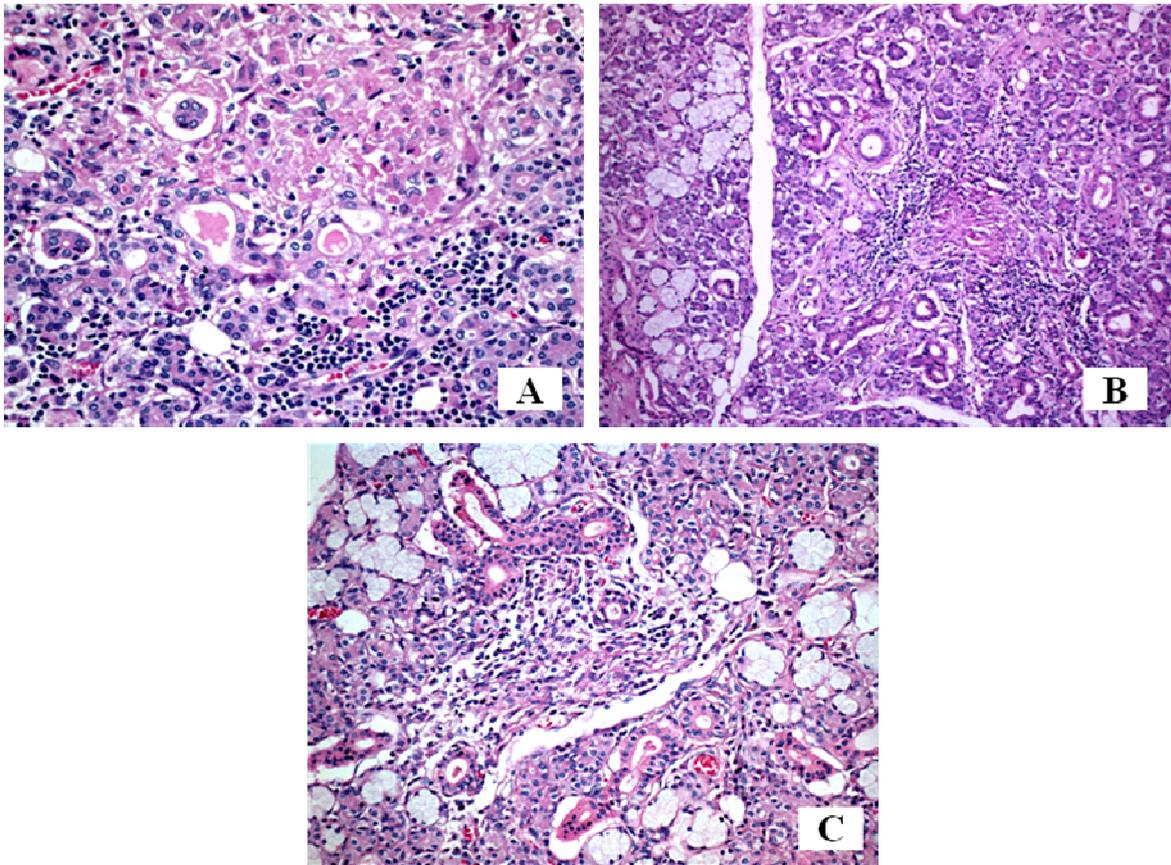
A tabela 08 mostra a imunofenotipagem de linfócitos no sangue periférico de 44 pacientes HIV positivos pelo método de Citometria de Fluxo do Laboratório Central do Hospital das Clínicas de São Paulo. Os exames de imunofenotipagem foram feitos com no mínimo de 1 a 371 dias. Em 19 casos o exame de imunofenotipagem não foi realizado. A média de linfócitos TCD4 nos 44 pacientes em que o exame foi realizado foi de 63,16 cels/ $\mu$ L ( $\pm$  101 células/ $\mu$ L). A média de linfócitos CD4 dos caos das glândulas parótida,

submandibular e sublingual foram 66,57 cels/ $\mu$ L, 39,43 cels/ $\mu$ L e 66,67 cels/ $\mu$ L respectivamente.

### **5.3 Aspectos microscópicos das glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais.**

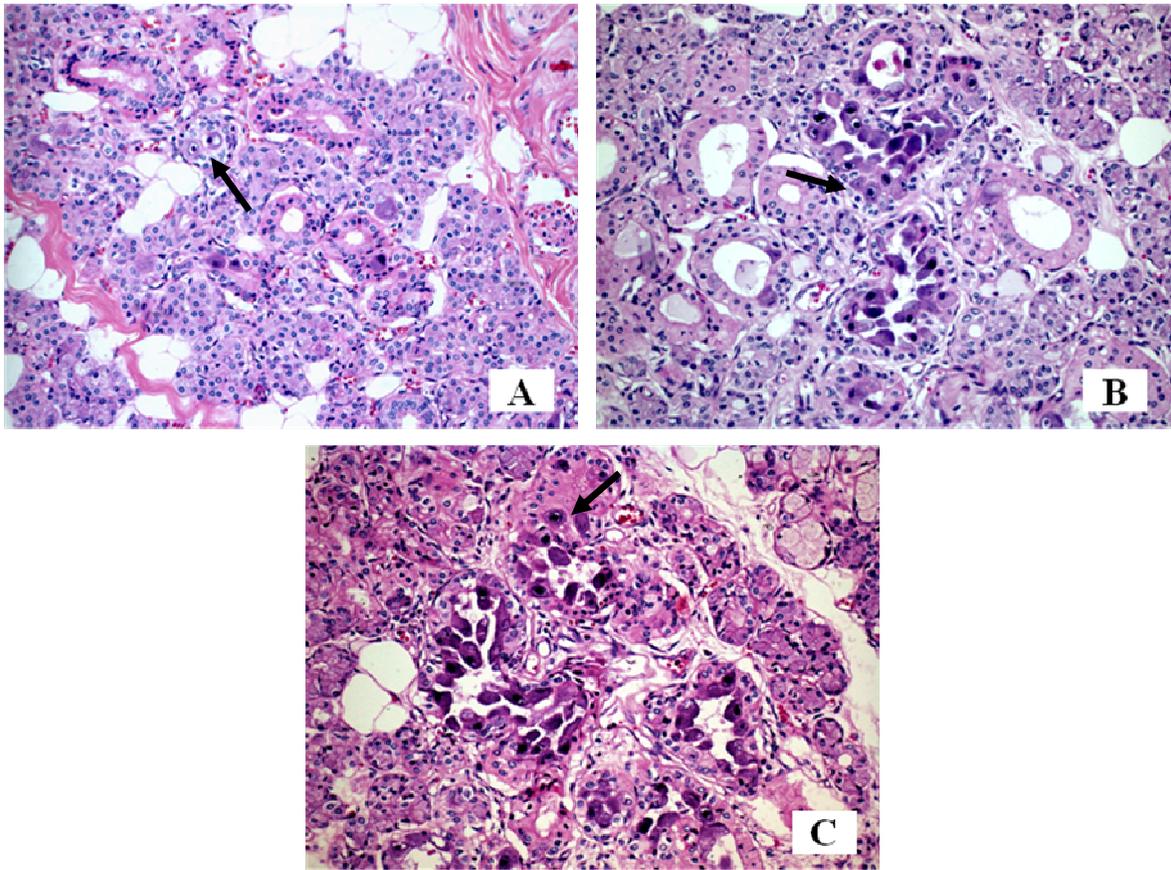
As tabelas 09, 10 e 11 mostram as alterações encontradas nas glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais de pacientes autopsiados com AIDS, após a avaliação histopatológica por meio das colorações histoquímica de rotina e especiais Ziehl-Neelsen, Grocott e Mucicarmim dos casos selecionados por Vargas *et al.* (2003) e Léon *et al.*(2008).

Nas micobacteriose de glândula salivar, se observa área de granuloma constituído por área de necrose caseosa circundado principalmente por linfócitos e macrófagos. Entretanto, em pacientes imunocomprometidos, esse padrão de granuloma pode não ser evidenciado. Nestes pacientes, observa-se extensa área de necrose com pouco infiltrado inflamatório (Figura 03)



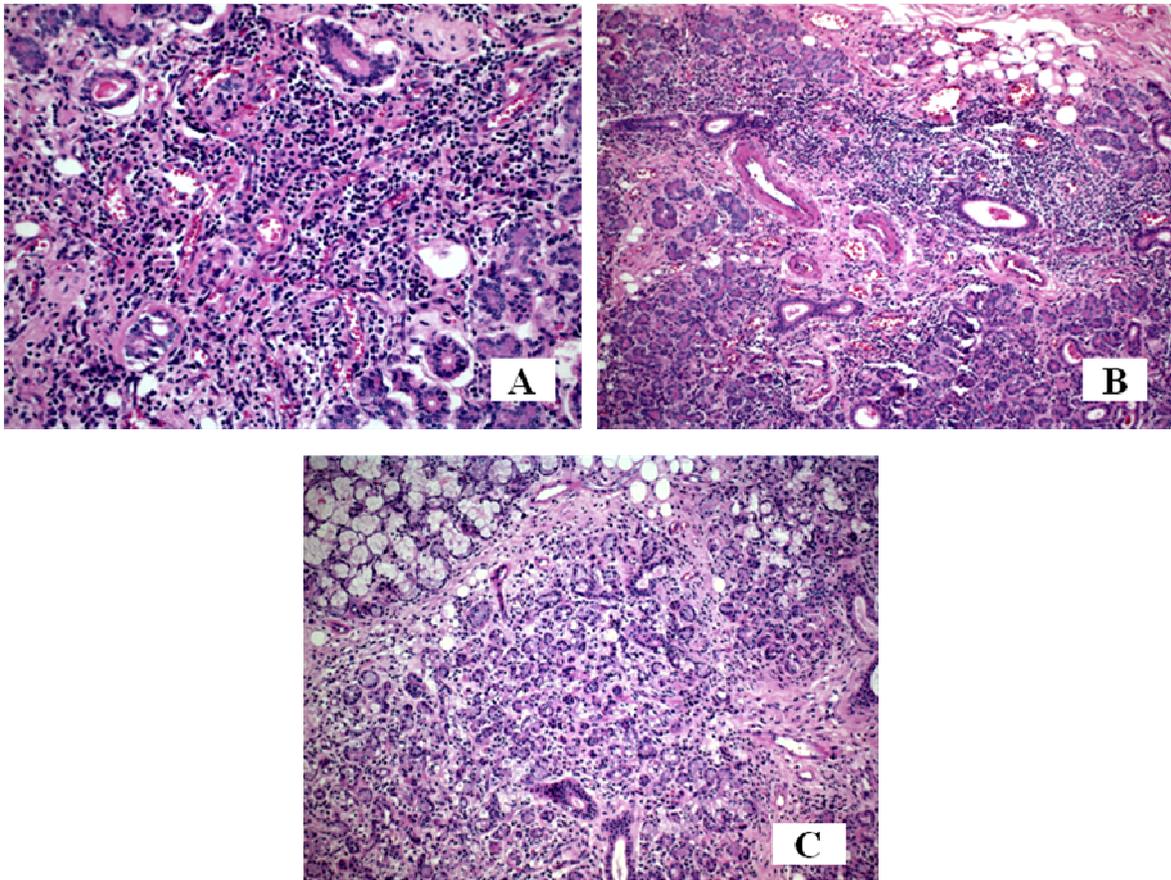
**Figura 03:** Micobacteriose em glândula parótida (A), glândula submandibular (B) e glândula sublingual (C). (Hematoxilina & Eosina – 200x).

Já nas lesões de citomegalovirus, nota-se aumento nuclear, mostrando halo oval ao redor do núcleo. Muitas vezes o aspecto denominado de olho de coruja é adotado. Nas glândulas salivares, estas inclusões podem ser observadas nos ductos salivares (Lewin-Smith *et al.* 1998) (Figura 04)



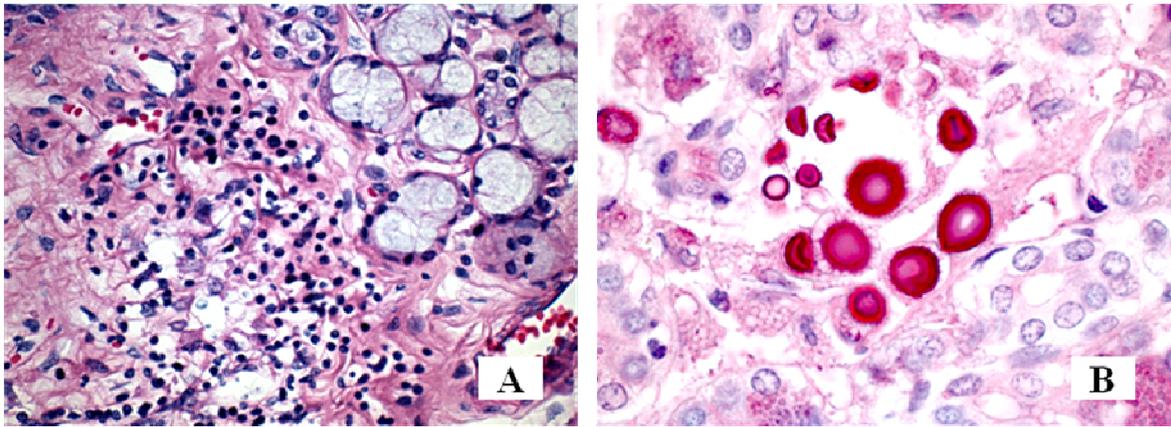
**Figura 04:** Infecção de CMV nos ductos salivares (setas) das glândulas parótida (A); submandibular (B); sublingual (C) (Hematoxilina & Eosina - 200x)

Microscopicamente, as sialadenites são caracterizadas por dilatação ductal, além de turgidez dos acinos celulares com granulações secretoras. É observada também, reação inflamatória periductal aumentada, com fibrose e inflamação por células inflamatórias crônicas. (Figura 05)



**Figura 05:** Sialadenite na glândula parótida (A); glândula submandibular (B) e glândula sublingual (C). (Hematoxilina & Eosina 200x)

Com relação a infecção pelo *Criptococcus neoforms*, microscopicamente, se observa reação inflamatória crônica e fungo com diferentes tamanhos que são positivos para a coloração de mucicarmim e grocott (Figura 06).



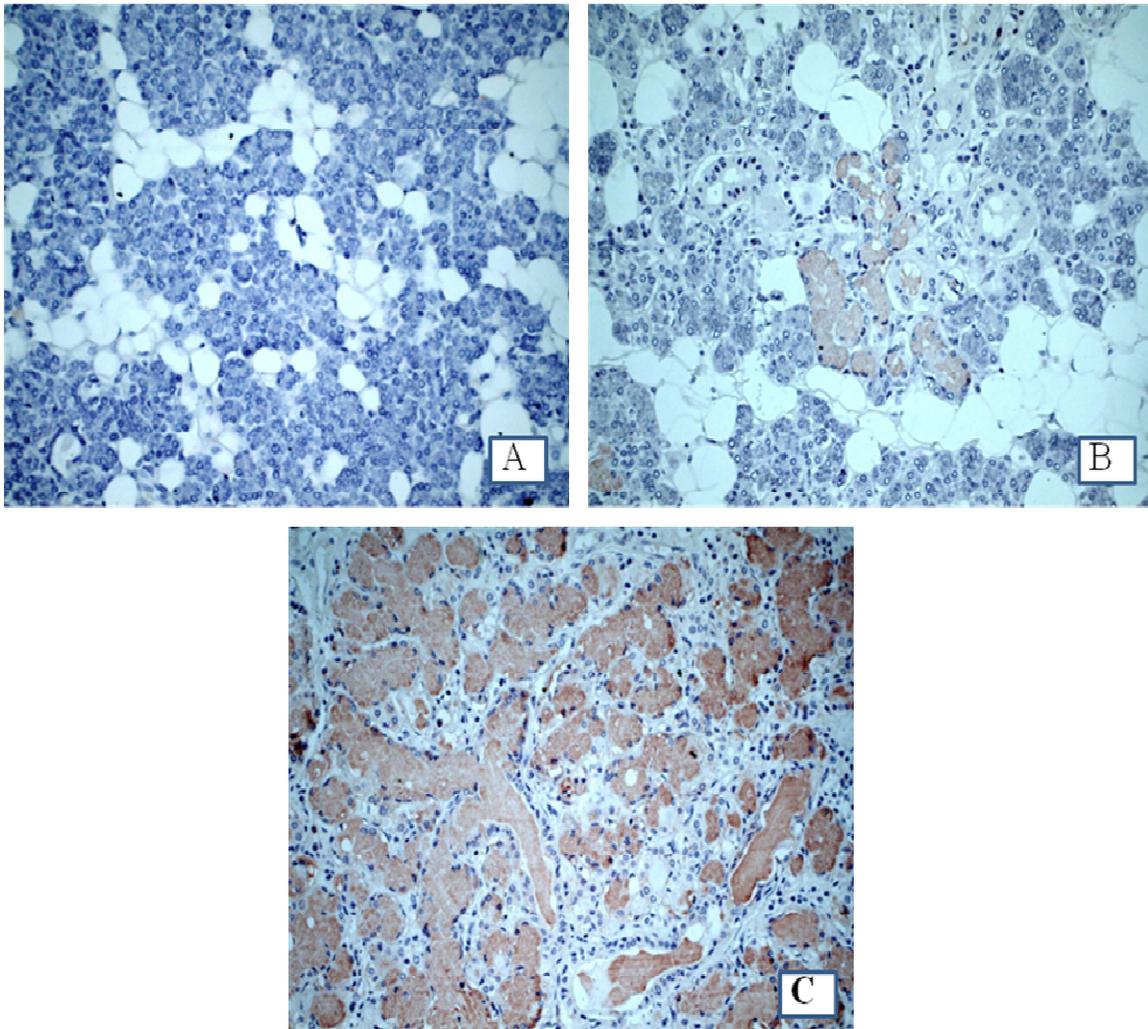
**Figura 06:** Criptococose em glândula submandibular- A glândula parótida corado por Hematoxilina & Eosina (seta). B- coloração para mucicarmim mostrando diferentes formas e tamanhos dos fungos (setas)

#### **5.4. Expressão imunoistoquímica das proteínas da família PLUNC**

As proteínas SPLUNC 1, SPLUNC 2A e SPLUNC 2B apresentaram marcação citoplasmática em ácinos, enquanto que a proteína LPLUNC 1 apresentou marcação citoplasmática em ductos.

##### **5.4.1. SPLUNC 1**

Todos os casos da glândula parótida dos 05 grupos não foram imunorreativos para o anticorpo SPLUNC 1, enquanto que nas glândulas submandibulares e sublinguais, o anticorpo SPLUNC 1 foi positivo nos acinos mucosos. A figura 07 mostra o padrão de marcação para SPLUNC 01 nas glândulas salivares maiores.



**Figura 07.** Padrão de marcação de SPLUNC 1. Observe que somente os ácinos mucoso presentes nas glândulas submandibular e sublingual foram positivos para SPLUNC 1 (coloração marrom). Note também que “plugs” de mucina presentes no interior dos ductos da glândula sublingual foram positivos para SPLUNC 1. A: glândula parótida; B: glândula submandibular e C: glândula sublingual. (Estreptavidina – biotina – peroxidase - 200x)

Grupo Controle:

Quando comparamos as glândulas submandibular (n=10) e sublingual (n=10) para o anticorpo SPLUNC 1, não observamos diferença estatisticamente significante na intensidade ( $p=0,655$ ) de marcação e nem na relação de área corada ( $p=0,480$ ) (Figura 07 B e C).

Grupo HIV positivo sem alteração:

Nesse grupo (n=10) foi observada positividade para SPLUNC 1 em ácinos mucosos das glândulas submandibular e sublingual. Quando comparados estatisticamente, não se observou significância na intensidade ( $p=0,112$ ) e na área corada ( $p=0,638$ ).

#### Grupo Micobacteriose:

Apenas 01 caso da glândula submandibular foi positivo para o anticorpo SPLUNC 1, o qual apresentava ácinos mucosos na periferia da lesão.

#### Grupo Citomegalovirose:

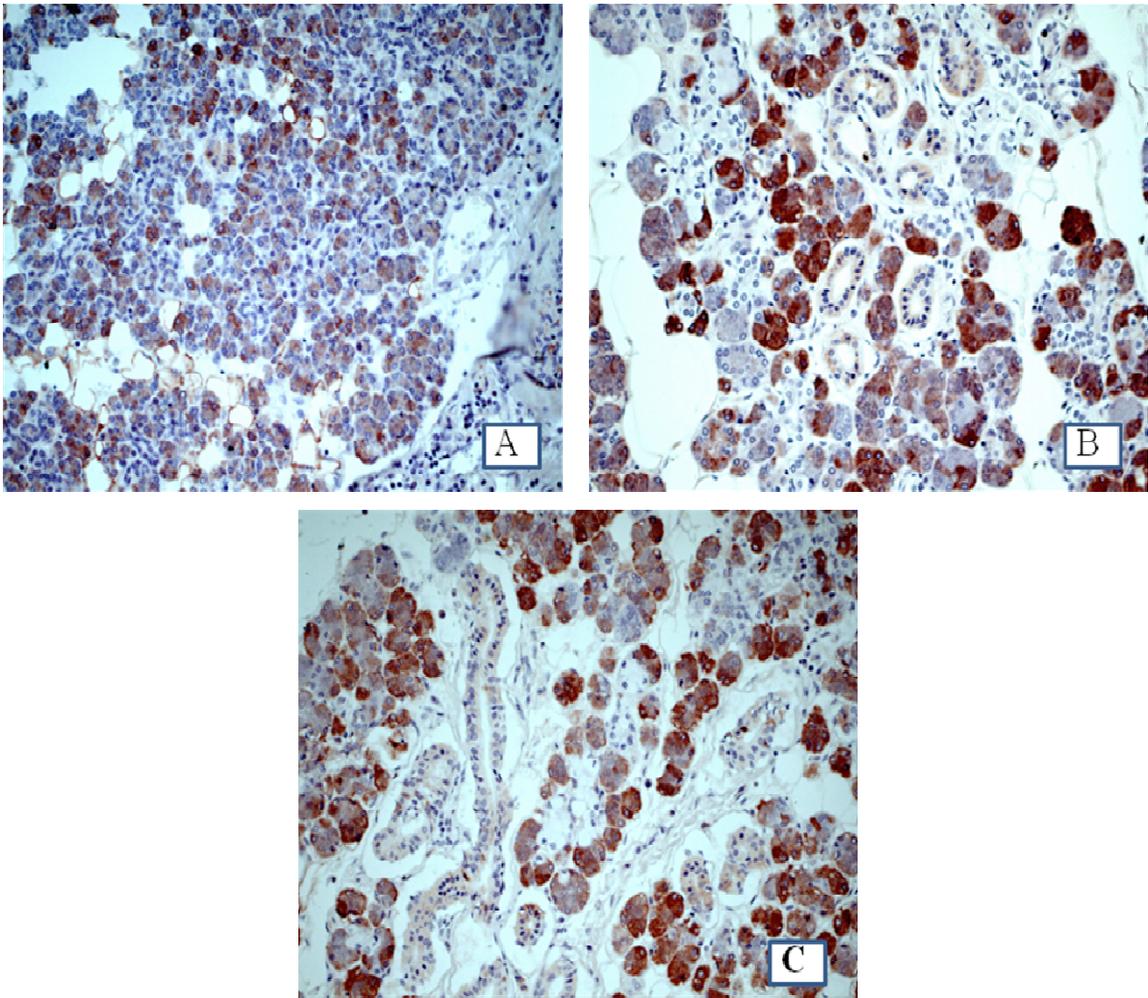
SPLUNC 1 foi negativa em todos os casos de citomegalovirose nas glândulas submandibulares (n=8) e sublinguais (n=1).

#### Grupo Sialadenite:

Dos 10 casos selecionados de cada uma das glândulas salivares maiores, apenas 05 casos da glândula submandibular apresentaram positividade para o anticorpo SPLUNC 1. Foi observada marcação nos ácinos mucosos, com fraca intensidade. Na glândula sublingual, todos os casos foram negativos.

### **5.4.2. SPLUNC 2A**

A figura 08 mostra o padrão de expressão do anticorpo SPLUNC 2 A nas glândulas salivares maiores. O anticorpo marcou células serosas das glândulas parótida, submandibular e sublingual, além da semilua serosa nas glândulas submandibular e sublingual.



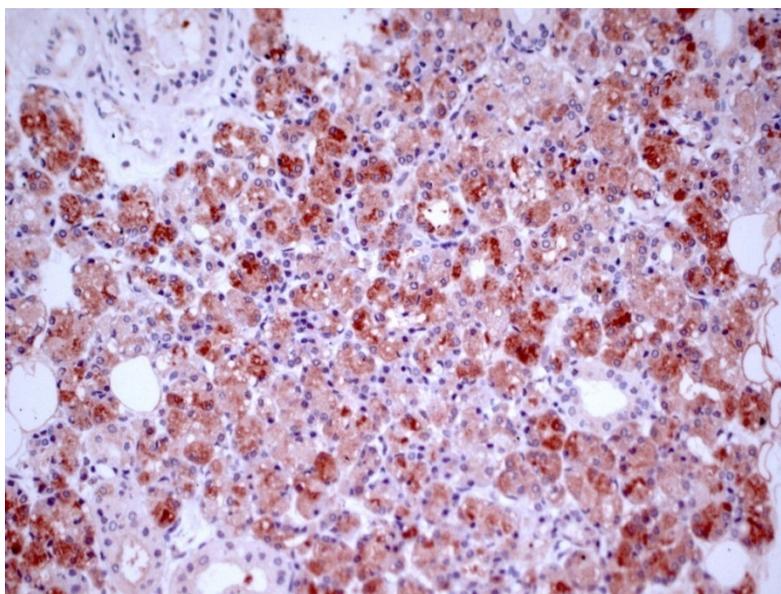
**Figura 08:** Padrão de marcação de SPLUNC 2 A.. Observe que somente os ácinos serosos presentes nas foram positivos para SPLUNC 2A (coloração marrom). A: glândula parótida; B: glândula submandibular e C: glândula sublingual. (Estreptavidina – biotina –peroxidase - 200x).

Grupo Controle:

Foi observada positividade nos acinos serosos e semilua serosa para o anticorpo SPLUNC 2A nas três glândulas estudadas, porém não se evidenciou diferença estatisticamente significativa quando comparada áreas coradas e intensidade de marcação. A mesma marcação foi evidenciada nos 10 casos estudados para a glândula submandibular e nos 10 casos da glândula sublingual.

Grupo HIV positivo sem alteração:

O anticorpo SPLUNC 2A foi positivo nas glândulas parótida (n=10), submandibular (n=10) e sublingual (n=10) neste grupo. No entanto, não foi observado significância nos resultados. A figura 09 mostra caso de expressão de SPLUNC 2A neste grupo glândula parótida)

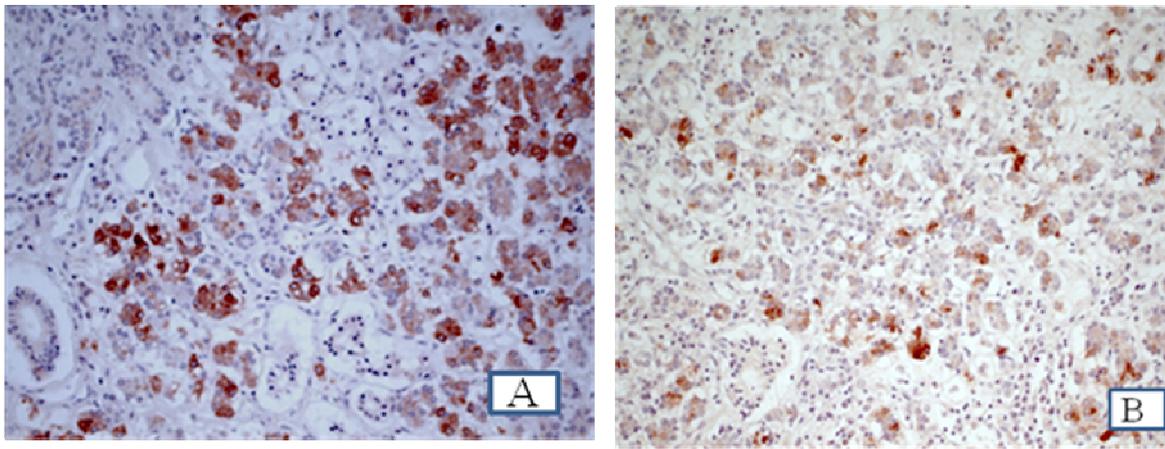


**Figura 09.** HIV positivo sem alteração - Glândula parótida. Intensa marcação em ácinos serosos para SPLUNC 2A. (Estreptavidina – biotina –peroxidase - 200x).

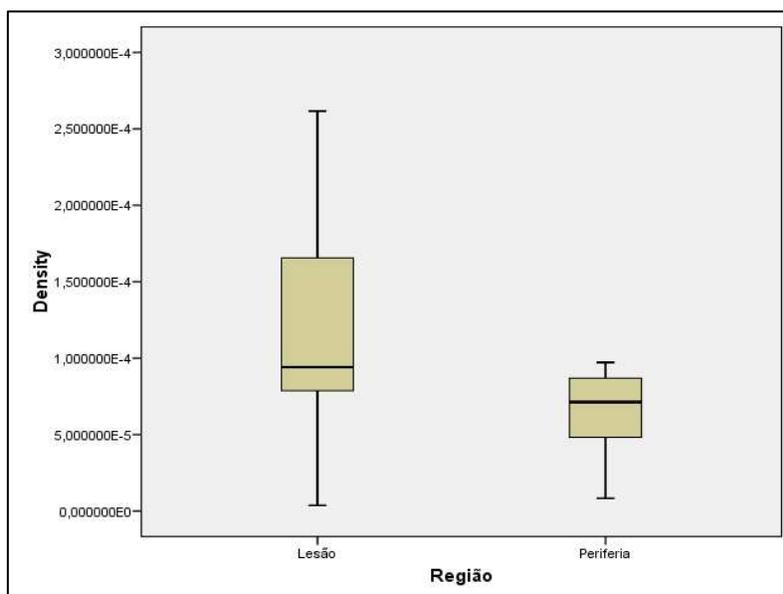
#### Micobacteriose:

Para este grupo foram estudados 08 casos na glândula parótida, 8 casos na glândula submandibular e 5 casos na glândula sublingual. Foi observado resultado estatisticamente significativo quando comparado essas duas regiões, com relação à intensidade ( $p=0,019$ ) em volta da lesão, sendo assim mais próximo da lesão observamos uma maior intensidade de marcação, embora na periferia, a área corada ( $p=0,404$ ) tenha sido maior, sua intensidade de marcação foi menor que em volta da lesão, sendo a proteína expressa de uma forma mais difusa (Figura 10). Os gráficos 01 e 02 mostram a intensidade de marcação em volta da lesão e na periferia da lesão dos casos de micobacteriose envolvendo as três glândulas. Quando analisamos separadamente cada glândula, observamos que a parótida apresentou

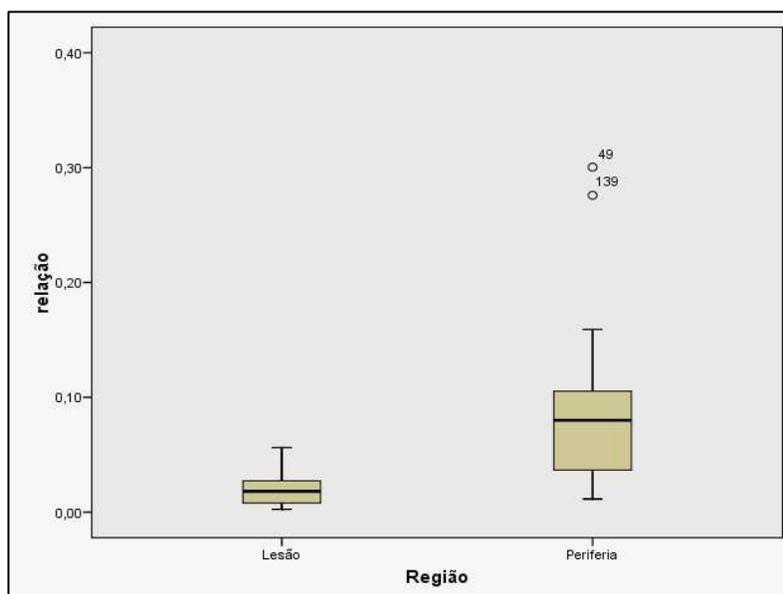
uma maior intensidade de marcação quando comparada com as glândulas submandibulares e sublinguais, porém essa maior intensidade na glândula parótida não mostrou significância frente às demais glândulas. Com relação à área corada, também observamos que a glândula parótida mostrou maior quantidade de área corada quando comparada com a glândula submandibular e sublingual, porém, da mesma forma como visto na intensidade não apresentou significância estatística. O gráfico 03 mostra esta diferença entre as glândulas com relação à intensidade, enquanto que o gráfico 04 mostra esta diferença em relação à área corada.



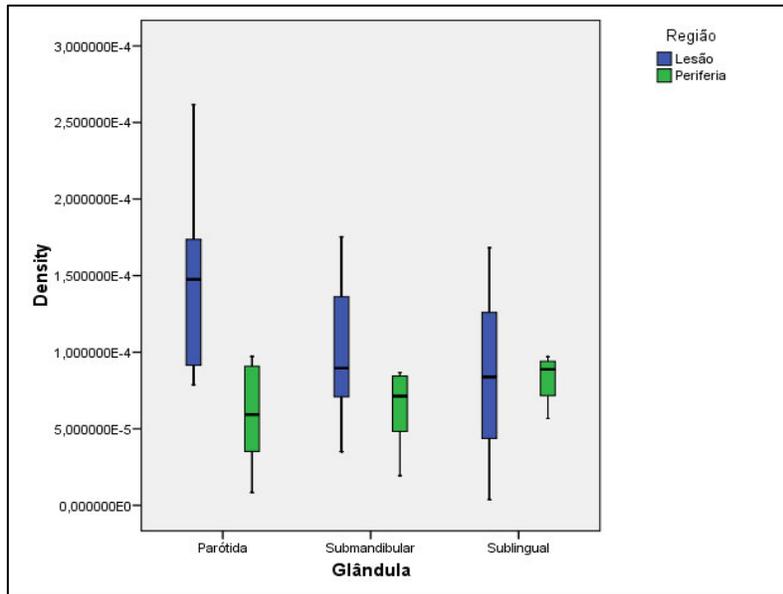
**Figura 10.** Micobacteriose na glândula parótida. A: área em volta da lesão e B: área na periferia da lesão para o anticorpo SPLUNC 2 A. (Estreptavidina – biotina –peroxidase - 200x).



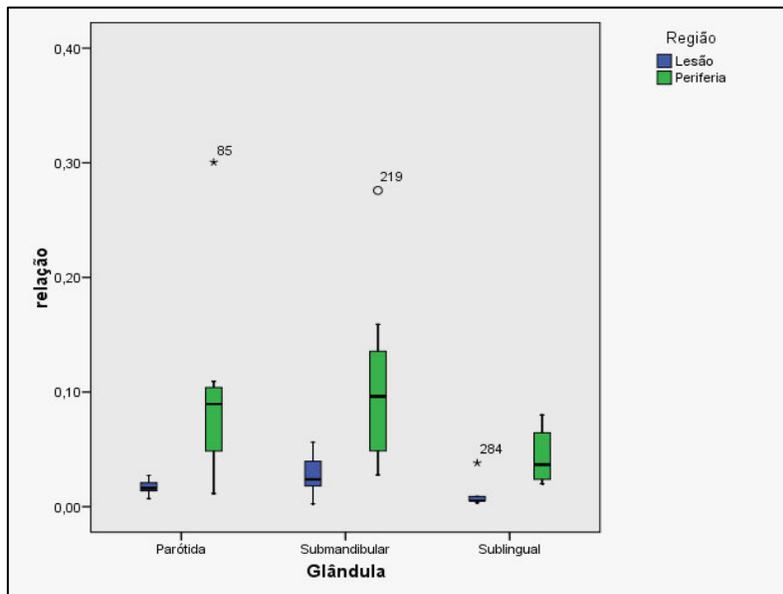
**Gráfico 01.** Grupo Micobacteriose. Comparação geral entre as glândulas parótida (n=8), submandibular (n=8) e sublingual (n=5) com relação à intensidade de marcação entre as regiões em volta e na periferia da lesão para o anticorpo SPLUNC 2 A.



**Gráfico 02.** Grupo Micobacteriose. Comparação geral entre as glândulas parótida (n=8), submandibular (n=8) e sublingual (n=5) com relação à área corada entre as regiões em volta da lesão e na periferia da lesão para o anticorpo SPLUNC 2A



**Gráfico 03. Grupo Micobacteriose.** Comparação entre as glândulas salivares maiores com relação à intensidade nas regiões em volta da lesão e na periferia da lesão de micobacteriose glandular para o anticorpo SPLUNC 2A.

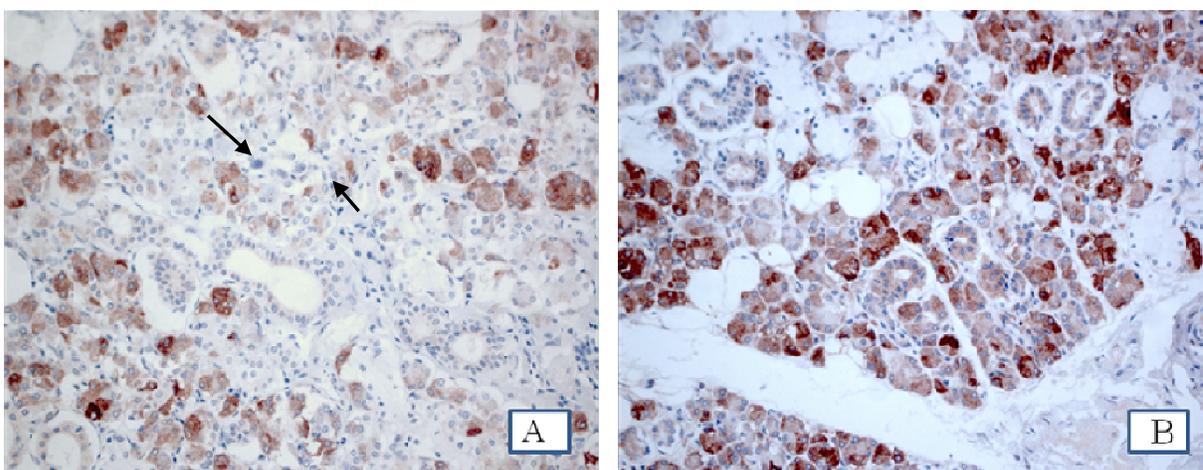


**Gráfico 04. Grupo Micobacteriose.** Comparação entre as glândulas salivares maiores com relação à área corada nas regiões em volta da lesão e na periferia da lesão de micobacteriose glandular para o anticorpo SPLUNC 2A.

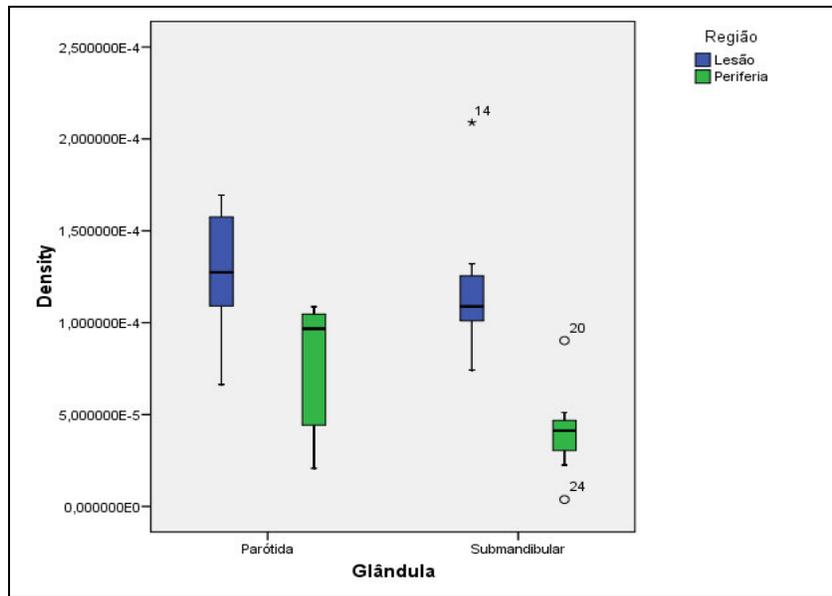
### Citomegalovirose:

Para esse grupo, foram selecionados 05 casos de CMV na glândula parótida, 08 casos para a glândula submandibular e apenas 01 caso para a glândula sublingual a partir de estudo previamente realizado por Vargas *et al.* 2003. Cinco casos da glândula parótida foram positivos para o anticorpo SPLUNC 2A em volta da lesão, enquanto que na periferia desses casos o anticorpo SPLUNC 2A mostrou positividade em todos os casos selecionados. Apenas 01 caso foi selecionado para a glândula sublingual, o qual foi positivo apenas nas áreas de periferia da lesão para o anticorpo SPLUNC2A.

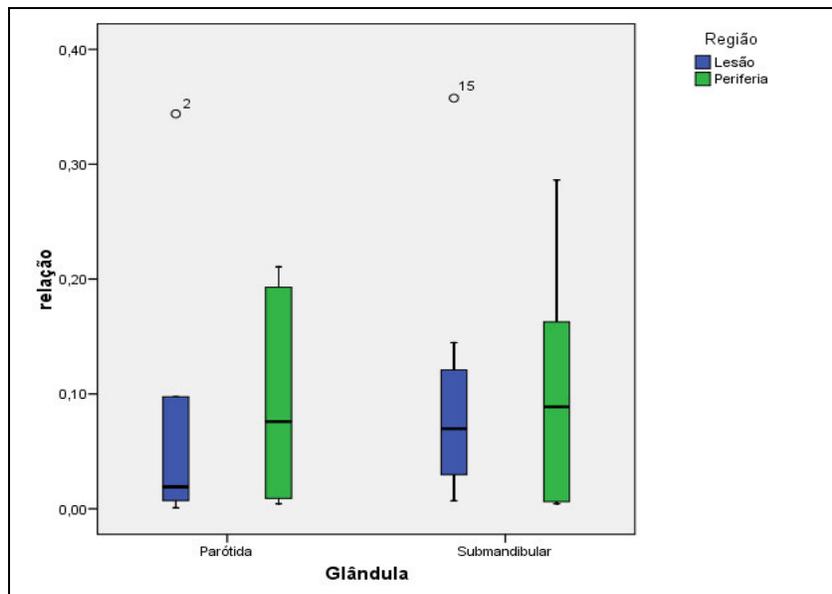
Assim como no grupo de micobacteriose, foi observada diferença estatisticamente significativa na intensidade na área da lesão quando comparada com a periferia da lesão (Figura 11). Comparamos os resultados apenas entre as glândulas parótidas e submandibulares, já que estudamos apenas 1 caso de CMV na glândula sublingual, o que não permite comparação estatística. Os gráficos 05 e 06 mostram as marcações nas diferentes regiões para o anticorpo SPLUNC2A para a intensidade e área corada. Embora a área corada na periferia da lesão seja maior que a área corada em volta da lesão, observamos uma maior intensidade de marcação em volta da lesão quando comparada com a periferia.



**Figura 11.** Citomegalovirose na glândula submandibular (97/905). A: área em volta da lesão (setas indicam o local de infecção) e B: área na periferia da lesão para o anticorpo SPLUNC 2A. (Streptavidina – biotina – peroxidase - 200x).



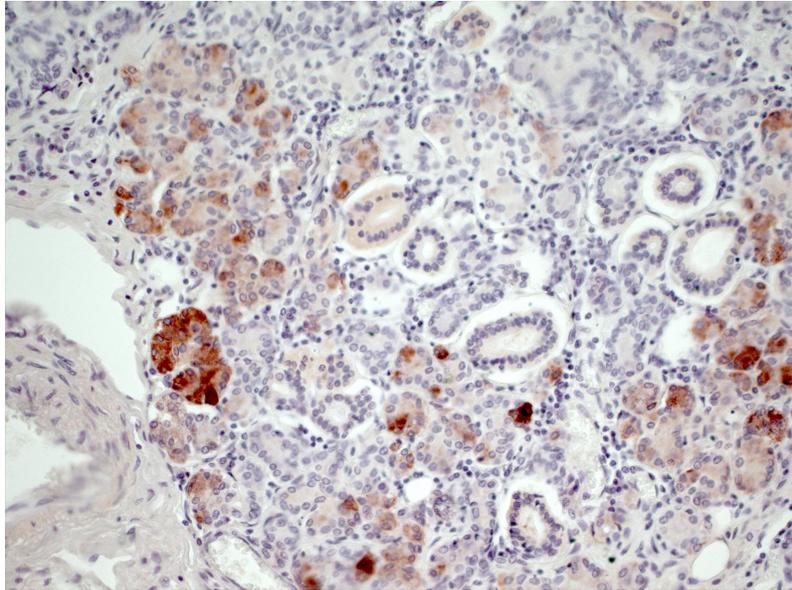
**Gráfico 05.** Grupo CMV. Comparação entre as glândulas parótidas (n= 5) e submandibulares (n= 08) com relação às regiões em volta da lesão e na periferia da lesão para o anticorpo SPLUNC 2A.



**Gráfico 06.** Grupo CMV. Comparação entre as glândulas parótidas (n= 5) e submandibulares (n= 8) com relação às regiões em volta da lesão e na periferia da lesão para o anticorpo SPLUNC 2A para a área corada

### Sialadenite:

Dez casos de cada glândula foram selecionados para esse grupo. Todos os casos selecionados foram positivos para o anticorpo SPLUNC 2A para a glândula parótida, submandibular e sublingual. Quando avaliado estatisticamente, não observamos níveis de significância para esse grupo. A figura 12 mostra discreta diminuição da expressão de SPLUNC 2 A nos casos de sialadenite.



**Figura 12.** Sialadenite em glândula submandibular. Observe discreta diminuição da expressão de SPLUNC 2A. (Estreptavidina – biotina – peroxidase - 200x)

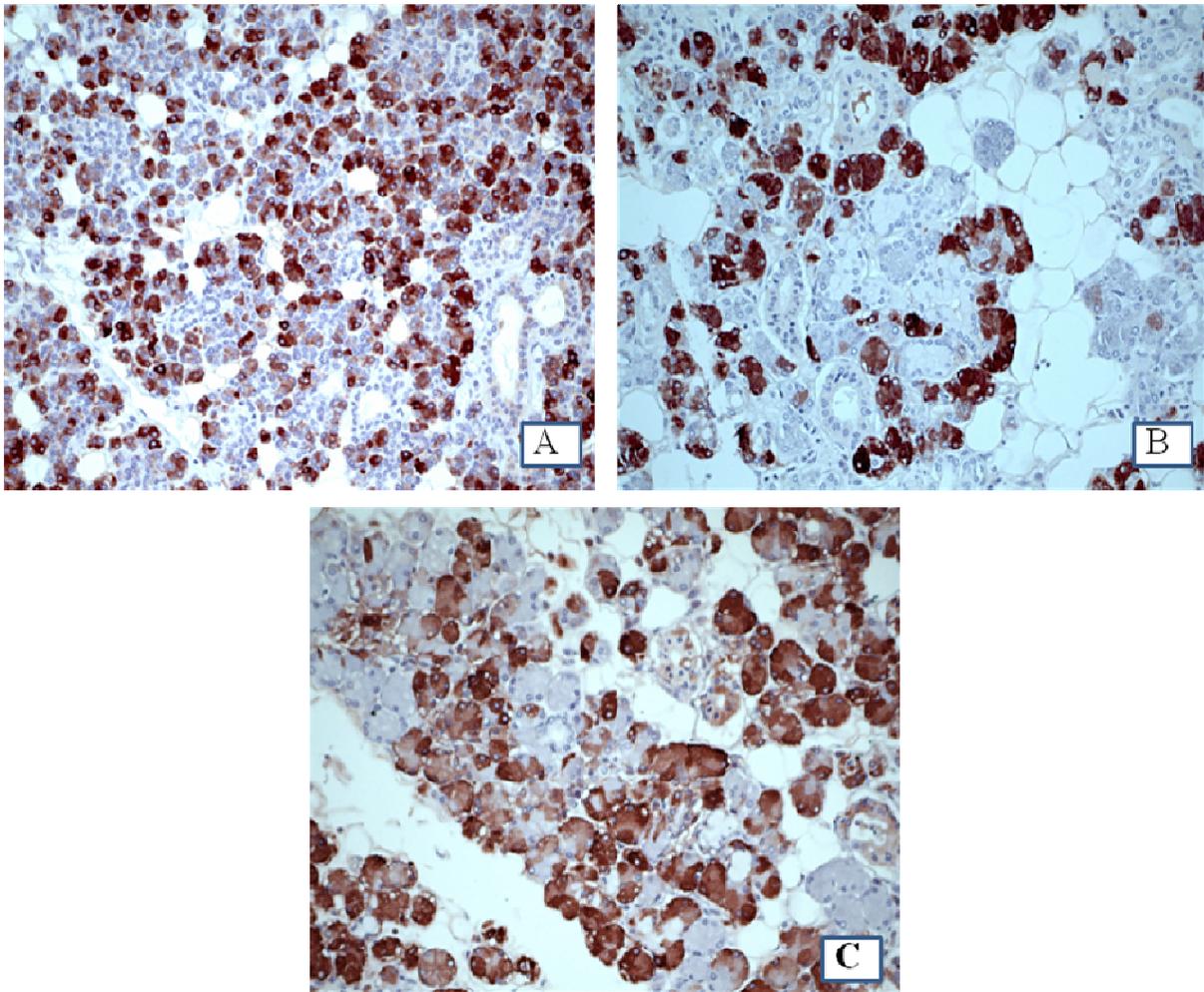
### **5.4.3. SPLUNC 2B**

SPLUNC 2B foi estudado em todos os grupos, assim como SPLUNC2A, mostrou positividade para os ácinos serosos e em semilua serosa, já que é a mesma proteína com dois anticorpos diferentes molecularmente. A figura 13 mostra o padrão de expressão do anticorpo SPLUNC 2B.

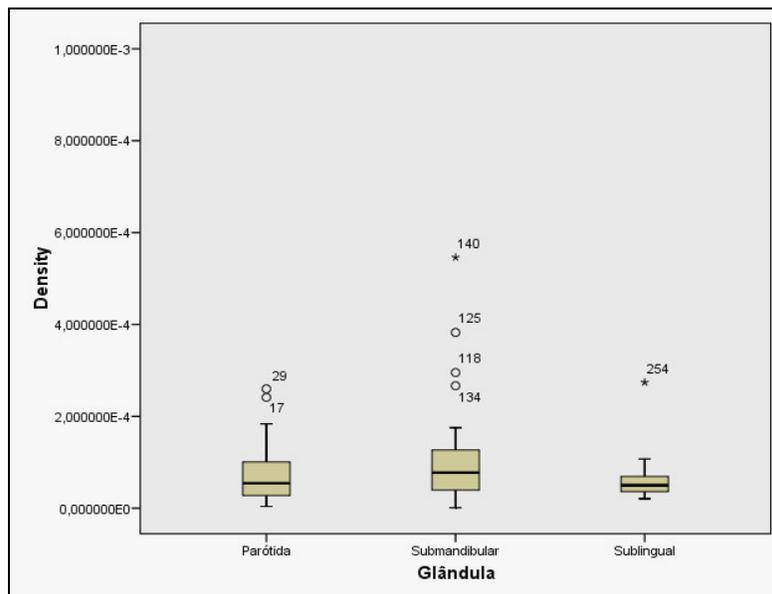
### Grupo Controle:

Todos os casos da glândula parótida (n=10), submandibular (n=10) e sublingual (n=10) foram positivos para SPLUNC 2B. Não foi evidenciada diferença estatisticamente

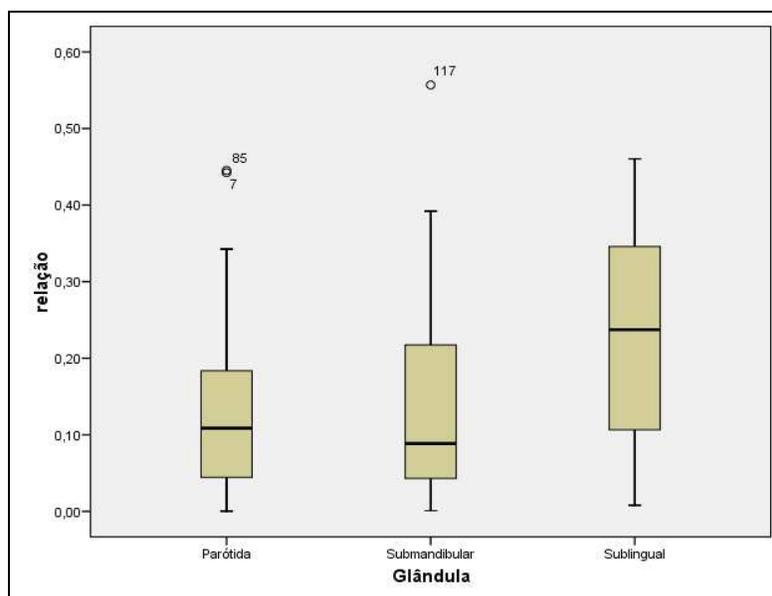
significante quando comparamos as três glândulas. Observamos uma maior intensidade de marcação na glândula parótida, porém não evidenciamos significância (Gráfico 07). Já com relação à área corada, é evidenciada uma maior área na glândula sublingual, porém também sem significância estatística (Gráfico 08).



**Figura 13.** Padrão de marcação de SPLUNC 2B. Observe que somente os ácinos serosos foram positivos para SPLUNC 2B. (coloração marrom). A: glândula parótida; B: glândula submandibular e C: glândula sublingual. (Estreptavidina – biotina –peroxidase - 200x)



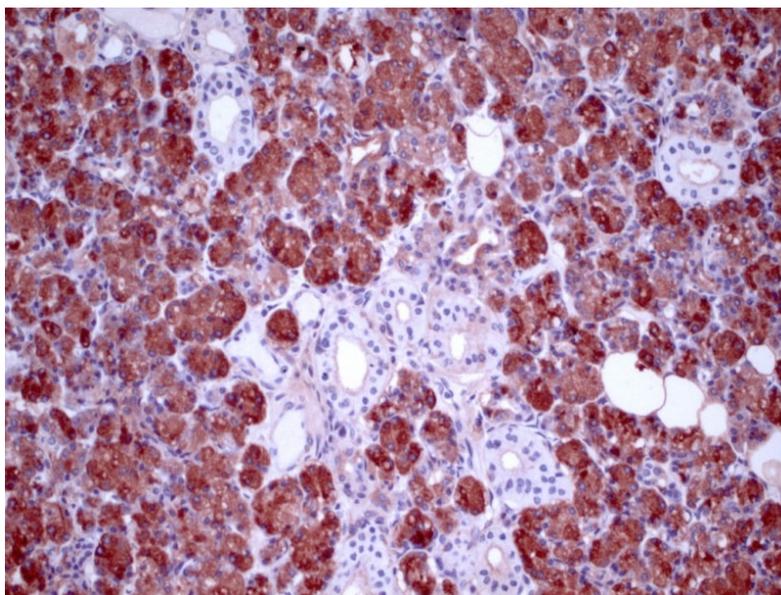
**Gráfico 07. Grupo Controle.** Comparação entre as glândulas parótidas (n= 10), submandibulares (n= 10) e sublinguais (n= 10) para o anticorpo SPLUNC 2B. Apesar de maior intensidade de marcação na glândula parótida, não evidenciamos diferença estatística entre as glândulas



**Gráfico 08. Grupo Controle.** Comparação entre as glândulas parótidas (n= 10), submandibulares (n= 10) e sublinguais (n= 10) para o anticorpo SPLUNC 2B com relação á área corada.

rupo HIV positivo sem alteração:

Dez casos de cada glândula foram selecionados, a glândula parótida e submandibular mostraram positividade para todos os casos, já para a glândula sublingual encontramos positividade em apenas 05 casos. Quando comparado estatisticamente as três glândulas, não observamos significância estatística nas glândulas, nem na intensidade e nem na área corada. A figura 14 mostra a expressão de SPLUNC 2B em um caso da glândula parótida do grupo 2.

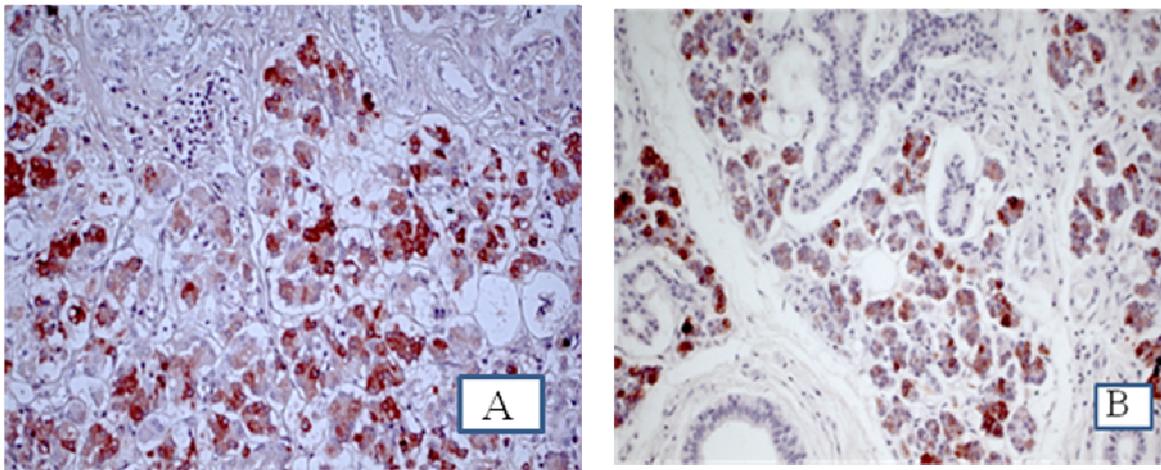


**Figura 14.** HIV positivo sem alteração em glândula parótida mostrando intensa positividade para SPLUNC 2B. (Streptavidina – biotina – peroxidase - 200x)

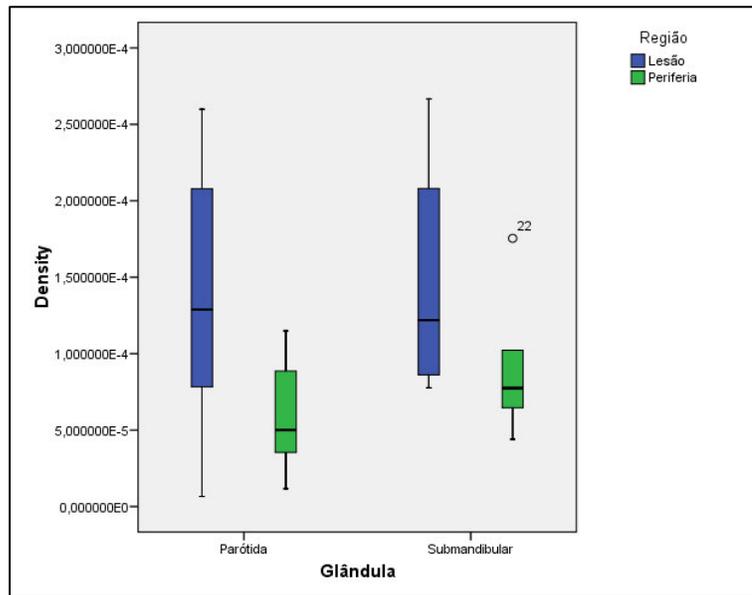
Micobacteriose:

A partir dos 08 casos de micobacteriose das glândulas parótidas e submandibulares, e 05 casos da glândula sublingual, observamos ao redor da lesão uma maior densidade de marcação quando comparado com a periferia. Apesar de a periferia possuir maior quantidade de área corada, sua densidade é menor (Figura 15), apresentando uma expressão mais difusa, enquanto que na área da lesão essa marcação é mais intensa. Foi observada também uma maior área positiva/parótida, sendo essa relação semelhante nas glândulas

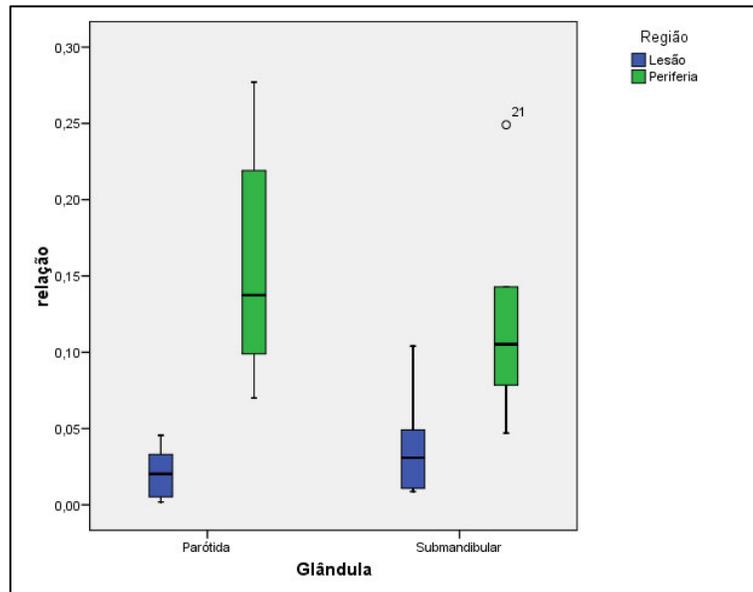
submandibulares e sublinguais. Os gráficos 9 e 10 mostram essa diferença. Como a glândula sublingual apresentou apenas 01 caso positivo para SPLUNC 2B, não foi possível avaliar estatisticamente sua marcação.



**Figura 15** Micobacteriose na glândula parótida. A: marcação de SPLUNC 2B em volta da lesão e na periferia da lesão (B) (Streptavidina – biotina –peroxidase - 200x)



**Gráfico 9.** Grupo Micobacteriose. Comparação entre as glândulas parótidas (n=8), submandibulares (n=8) e sublinguais (n=5) com relação às regiões em volta da lesão e na periferia da lesão para o anticorpo SPLUNC 2B mostrando maior intensidade na lesão que na periferia.

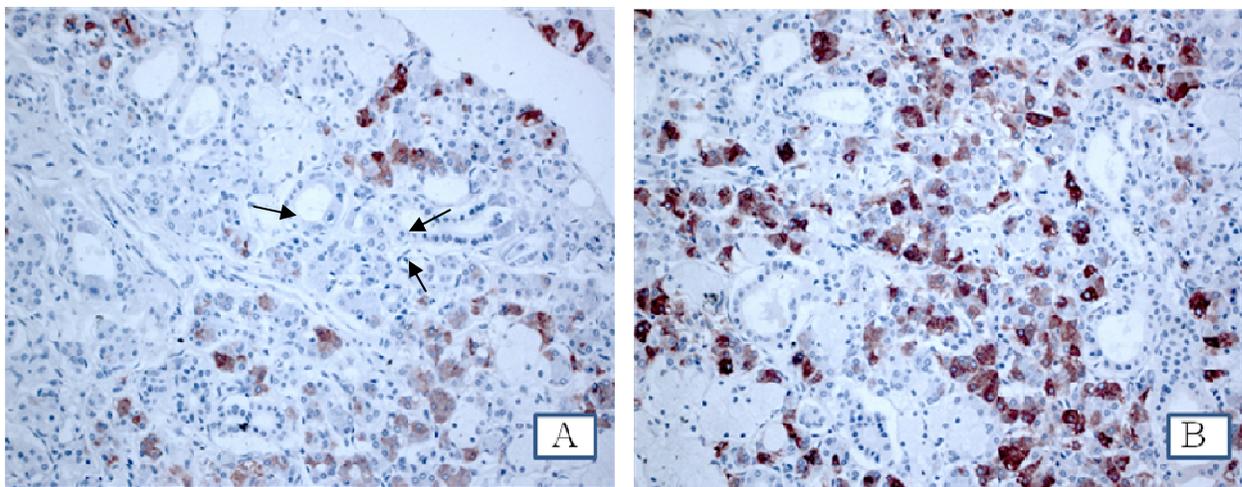


**Gráfico 10.** Grupo Micobacteriose. Comparação entre as glândulas parótidas (n= 8), submandibulares (n= 8) e sublinguais (n=5) com relação às regiões em volta da lesão e na periferia da lesão para o anticorpo SPLUNC 2B mostrando maior área corada na lesão que na periferia.

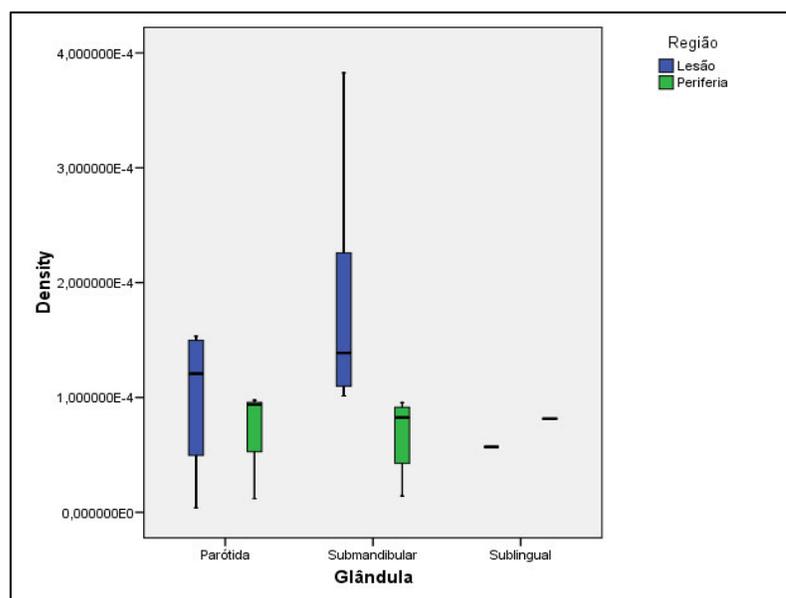
### Citomegalovirose:

Dos casos selecionados (n=5) para esse grupo, 02 casos foram negativos na glândula parótida, tanto na área de lesão quanto na periferia. Já na glândula submandibular (n=8), todos os casos foram positivos em ambas as áreas estudadas. Apenas 01 caso foi selecionado para a glândula sublingual, o qual foi positivo apenas nas áreas de periferia da lesão para o anticorpo SPLUNC2 B.

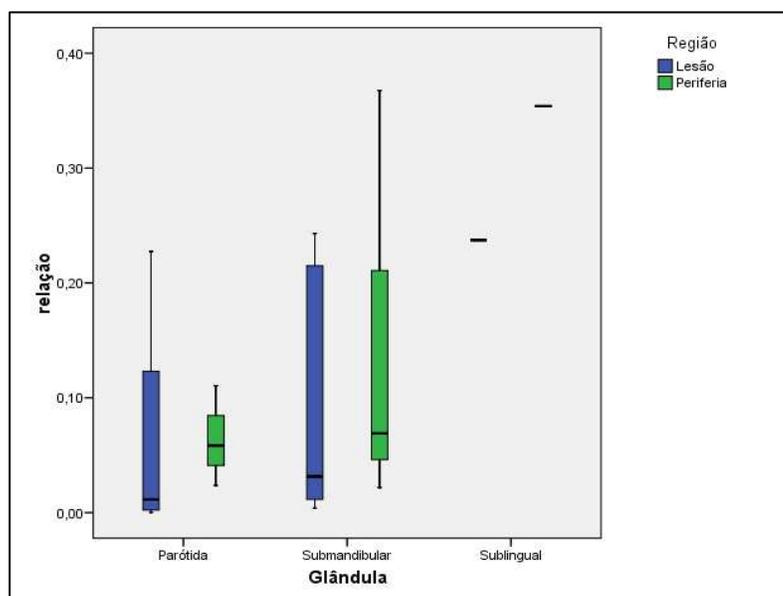
Assim como no grupo de micobacteriose, foi observada diferença estatisticamente significativa na intensidade na área da lesão quando comparada com a periferia da lesão (Figura 16). O gráfico 11 mostra maior intensidade de marcação na área de lesão quando comparado com a periferia da lesão. O gráfico 12, da mesma, forma que nas micobacteriose mostra maior área corada na periferia que ao redor da lesão.



**Figura 16** Citomegalovirose em glândula submandibular. Apesar de menor quantidade de área corada, a intensidade de marcação foi maior que na periferia da lesão. (Streptavidina – biotina –peroxidase - 200x)



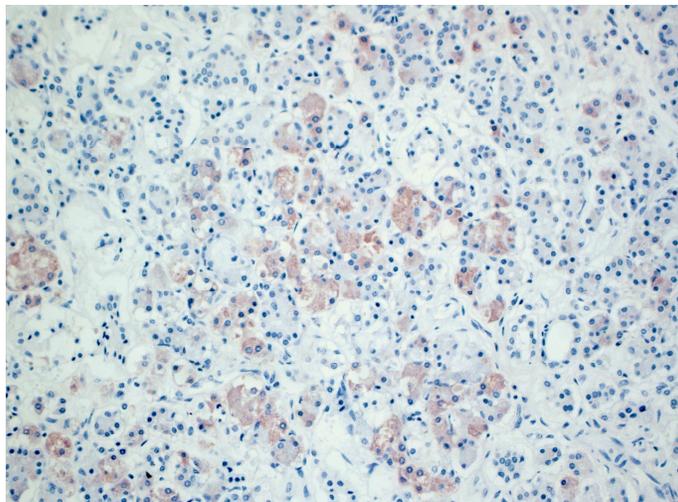
**Gráfico 11. Grupo CMV.** Comparação entre as glândulas parótidas (n= 5) e submandibulares (n=8) com relação às regiões em volta da lesão e na periferia da lesão para o anticorpo SPLUNC 2B com relação a intensidade



**Gráfico 12. Grupo CMV.** Comparação entre as glândulas parótidas (n=5) e submandibulares (n=8) com relação às regiões em volta da lesão e na periferia da lesão para o anticorpo SPLUNC 2B com relação á área corada.

### Sialadenite:

Todos os casos da glândula parótida (n=10), submandibular (n=10) e sublingual (n=10) foram positivos para esse anticorpo. No entanto, quando comparado estatisticamente não evidenciamos significância. A figura 17 mostra a expressão de SPLUNC 2B em um caso de sialadenite de glândula submandibular

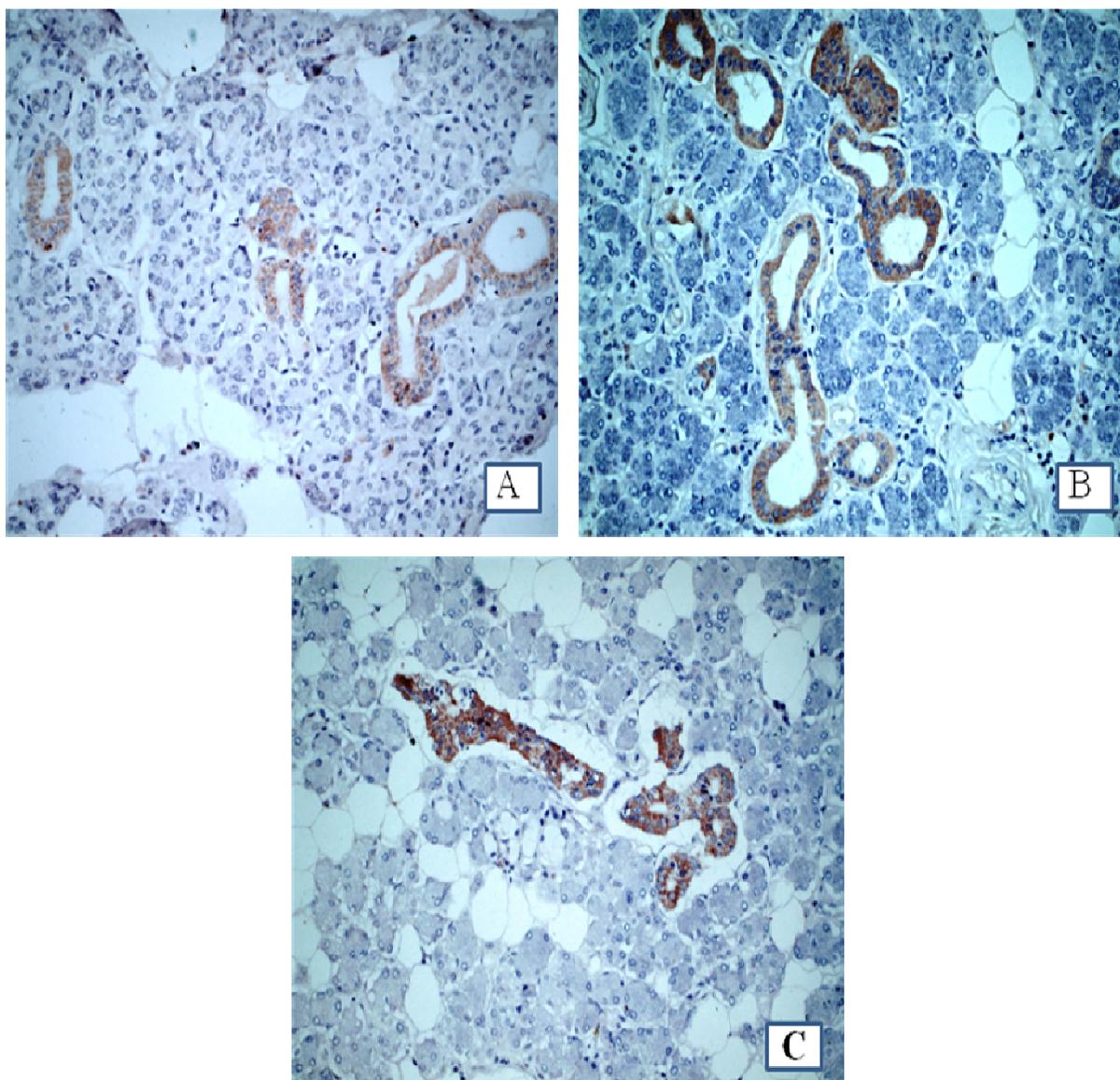


**Figura 17.** Sialadenite em glândula submandibular mostrando a expressão de SPLUNC 2B. (Streptavidina – biotina – peroxidase - 200x

#### **5.4.4. LPLUNC 1**

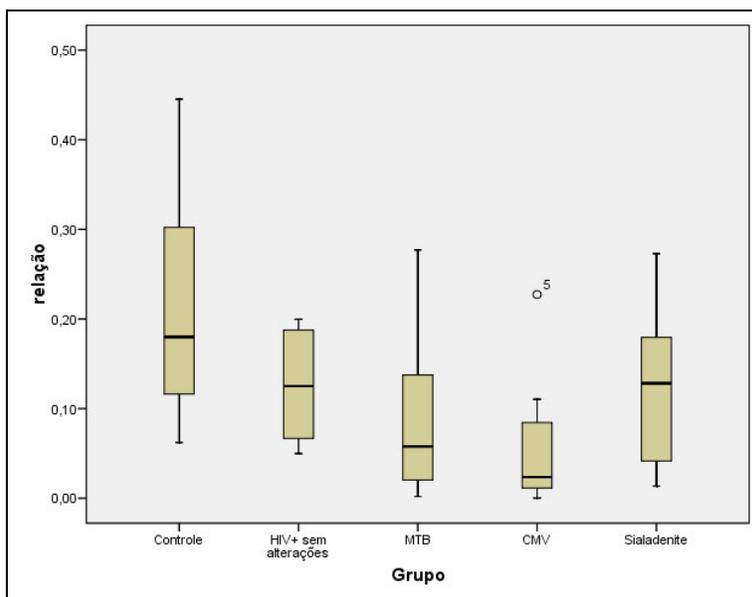
O anticorpo LPLUNC 01 foi positivo apenas nos ductos intercalares, estriados e excretorios (Figura 18), sendo totalmente negativo nos ácinos serosos e mucosos. No grupo controle, 07 casos foram positivos na glândula parótida. Já nas glândulas submandibular e sublingual, foi observado positividade em 8 casos de cada uma das glândulas. No grupo HIV positivo sem alteração (n= 10), observamos marcação em 06 casos para a glândula parótida, em 07 casos para a glândula submandibular e em todos os casos da glândula sublingual (n=10). Foi observada marcação variando de fraco a intenso nos ductos estriados, intercalares e excretorios. No grupo das lesões de micobacteriose foi evidenciado positividade em apenas 02 casos da glândula parótida, em 3 casos na glândula submandibular e em apenas 01 caso na glândula sublingual. Já no grupo citomegalovirose,

observamos negatividade em todos os casos da glândula parótida e positividade em apenas 03 casos da glândula parótida e no único caso selecionado de citomegalovirose na glândula sublingual observamos positividade para o anticorpo. No grupo das sialadenites, LPLUNC 01 foi positivo em apenas 04 casos da glândula parótida e em 03 casos das glândulas submandibular e sublingual.

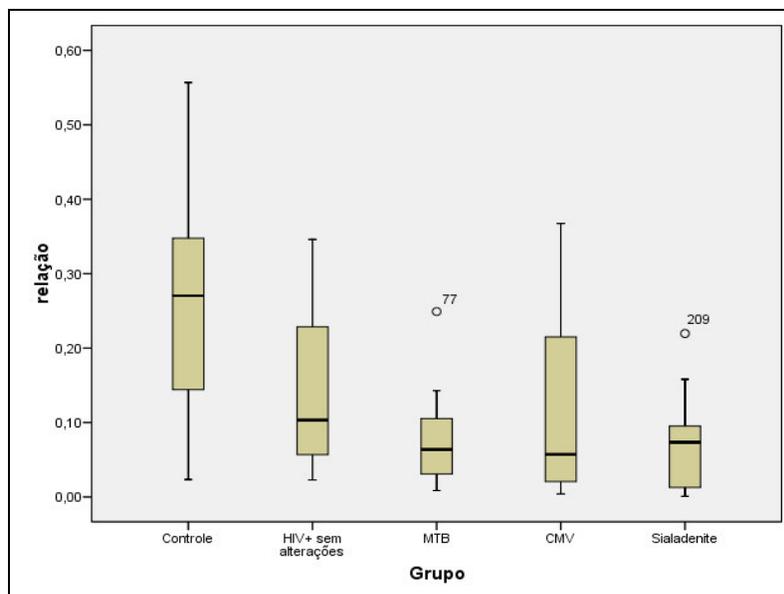


**Figura 18.** Expressão de LPLUNC 1 nas glândulas salivares maiores. A: glândula parótida); B: glândula submandibular ; C glândula sublingual (Streptavidina – biotina –peroxidase - 200x)

Em resumo, todos os casos da glândula parótida de todos os grupos foram negativos para o anticorpo SPLUNC 1. Quando todos os grupos foram comparados, na glândula parótida não se observou diferença estatisticamente significativa na densidade e nem na relação (área corada dividida pela área total) para o anticorpo SPLUNC 2A. No entanto, foi observada diferença estatisticamente significativa na relação área positiva e área corada ( $p=0,006$ ), mais não na intensidade de marcação para o anticorpo SPLUNC 2B (Gráfico 13). Na glândula submandibular, não se observou diferença estatisticamente significativa para os anticorpos SPLUNC 1 e SPLUNC 2 A. Assim como na glândula parótida, observamos diferença com significância estatística ( $p=0,001$ ) apenas na relação da área corada para o anticorpo SPLUNC 2B mais não na intensidade de marcação (Gráfico 14). Já na glândula sublingual nenhum dos anticorpos mostrou diferença estatisticamente significativa. Para o anticorpo LPLUNC 01 foi observado marcação somente nos ductos. Foi observado positividade em 42,22%, 51,06% e 63,88% para as glândulas parótida, submandibular e sublingual respectivamente.



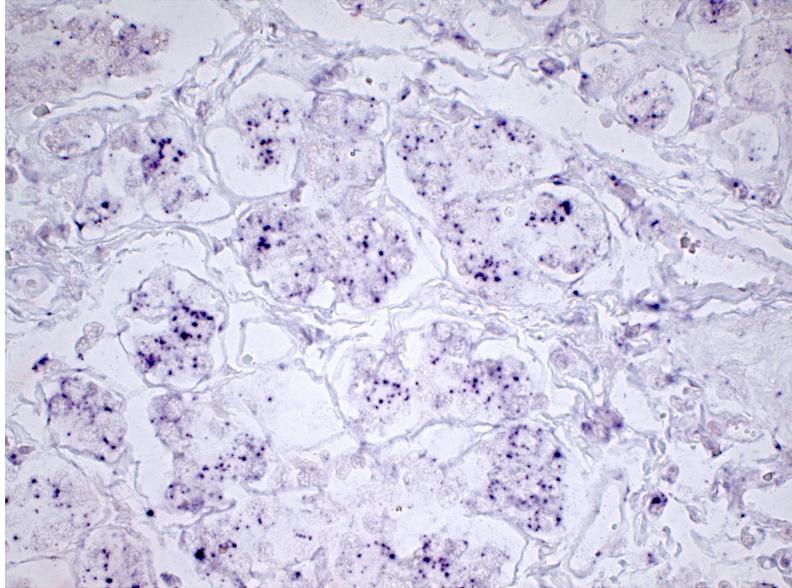
**Gráfico 13.** Comparação entre os grupos na glândula parótida para o anticorpo SPLUNC 2B com relação à área corada.



**Gráfico 14.** Comparação entre os grupos na glândula submandibular para o anticorpo SPLUNC 2B em relação à área corada

### 5.5. Hibridização *in situ* para SPLUNC2 no grupo controle

Todos os casos controle das três glândulas (n= 30) foram positivos para a técnica de hibridização *in situ* para SPLUNC 2. Nós observamos uma marcação mais intensa e puntiforme na periferia dos ácinos serosos de todos os casos. Os achados da HIS mostram uma maior concentração de SPLUNC 2 perinuclear (Figura 19), o qual foi corado na cor roxa. Não tivemos tempo de realizar a HIS nos outros grupos, pois a sonda produzida no Departamento de Patologia Oral da Universidade de Sheffield-UK durante o meu estagio em meados de 2008 não foi enviada para Piracicaba a tempo de concluirmos estes experimentos.



**Figura 19:** Padrão de expressão para Hibrização *in situ* para SPLUNC 2 em glândula submandibular. A marcação é perinuclear. Hibrização *in situ* 400x.

## 6. DISCUSSÃO

A média de idade dos pacientes do grupo controle foi de aproximadamente 61 anos, enquanto que a média de idade dos pacientes com AIDS autopsiados no presente estudo foi de 37 anos confirmando que a AIDS é prevalente em adultos jovens (UNAIDS, Rana *et al.* 2000; Eza *et al.* 2006). Segundo o Ministério da Saúde, em 1985 a proporção de homem:mulher infectados pelo HIV era de 25:1, já no final de 2007, esta proporção era de 2:1. No presente grupo de pacientes com AIDS a relação homem:mulher foi também de 2:1.

No grupo controle as principais causas de óbitos foram choque séptico (n=3) (28,57%), tromboembolismo (n=2) (4,29%) e acidente vascular cerebral (n= 2) (14,29%), já no grupo de pacientes com AIDS foram choque séptico (n=16, 28,57%), micobacteriose (n=12) (17,46%), broncopneumonia (n=4) (7,9%), pneumonia (n=4) (7,9%) e insuficiência respiratória (n=4) (7,9%). Esses dados confirmam a importância das infecções bacterianas como a tuberculose e doenças fúngicas nos óbitos dos pacientes com AIDS. Micobacteriose, citomegalovirose, pneumocistose, toxoplasmose, criptococose e LNH foram os principais achados na folha frontal padrão, confirmando a necessidade do uso de drogas profiláticas antimicrobianas associadas ao tratamento antiretroviral.

Vários trabalhos avaliaram as doenças sistêmicas presentes em pacientes autopsiados com AIDS nos últimos anos (Drut *et al.* 1997; Hsiao *et al.* 1997; Kaiser *et al.* 2000; Ohtomo *et al.* 2000; Eza *et al.* 2006) com especial ênfase ao impacto da terapia antiretroviral (Jellinger *et al.* 2000, Masliah *et al.* 2000). Existem poucos estudos avaliando o envolvimento das glândulas salivares maiores (Ihrler *et al.* 1996, Vargas *et al.* 2003, Léon *et al.* 2008).

“Palate, lung and nasal epithelium clone (PLUNC)”, é um gene descrito primeiramente por Weston *et al.* (1999) no epitélio embrionário do palato e fossas nasais de ratos e no epitélio traqueobrônquico do pulmão de camundongos adultos. Bingle & Bingle em 2000 caracterizaram o gene PLUNC humano que contém 1020 pb e está localizado no cromossomo 2q11. A função de PLUNC ainda é incerta, porém devido à superexpressão de PLUNC em epitélios expostos a injúrias, pode ser sugerido que estas proteínas sejam secretadas como produtos com papel protetor (Bingle & Craven, 2003). Vargas *et al.*

(2008) determinaram a expressão das proteínas PLUNC em 64 tumores benignos e malignos de glândulas salivares através da técnica de imunistoquímica para SPLUNC1, SPLUNC2 e LPLUNC1. Os autores observaram a expressão de PLUNC somente nos carcinomas mucoepidermóides e cistoadenocarcinoma papilar. “Plugs” de mucina, células mucosas e células intermediárias do carcinoma mucoepidermóide foram positivas para LPLUNC1 e SPLUNC2, mas áreas compostas de células claras e epidermóides foram negativas para todos os subtipos de PLUNC estudados.

Todos os casos da glândula parótida foram negativos para SPLUNC 1, o qual mostrou positividade somente nos ácinos mucosos das glândulas submandibulares e sublinguais, o que já foi previamente relatado por Bingle *et al.* (2005), os quais também demonstraram positividade para PLUNC em ácinos mucosos de trato respiratório. Bingle *et al.*(2005) observaram a expressão de SPLUNC 1 em células mucosas, em ductos de glândulas submucosas, glândulas menores do nariz, seios paranasais, região posterior da língua e tonsila. Não houve diferença estatisticamente significativa em nenhum grupo para esse anticorpo quanto à intensidade e área corada. Alguns casos das glândulas submandibulares e sublinguais foram completamente negativos para SPLUNC 01, os quais devem ter sido resultados de falhas nas etapas do estudo imunistoquímico ou problemas de fixação inadequada das glândulas salivares por formaldeído, uma vez que todos nossos casos foram provenientes de autópsia.

SPLUNC2 é uma proteína de 249 aminoácidos que é expressa em células serosas de glândulas salivares. Os anticorpos SPLUNC2A e 2B diferem antigenicamente, no entanto apresentam o mesmo padrão de marcação. Com relação aos anticorpos SPLUNC 2A e 2B, observamos imunomarcação em ácinos serosos e nas semiluas serosas. Apesar de apresentar uma marcação intensa, dos 05 grupos comparados, encontramos significância apenas nos casos de infecção por CMV e MTB quando comparado as regiões em volta e periferia da lesão. Diferentemente de Vargas *et al.* (2008) que observaram positividade para SPLUNC 2 nos “Plugs” de mucina, células mucosas e células intermediárias dos carcinomas mucoepidermóide, não encontramos marcação de células mucosa para esse anticorpo. Esse é o primeiro trabalho mostrando a expressão dessas proteínas em pacientes com AIDS, logo mais trabalhos são necessários para confirmar ou não nossos achados.

LPLUNC 1 é composta por 484 aminoácidos, e Bingle & Craven (2002) demonstraram sua marcação em glândulas submandibulares. Em nosso estudo LPLUNC 1 mostrou marcação apenas em ductos estriados, intercalares e excretorios, mas isto foi detectado em todos os grupos. Vargas *et al.* (2008) também observaram positividade para LPLUNC 1 nos “Plugs” de mucina, células mucosas e células intermediárias dos carcinomas mucoepidermóide. Os autores não encontraram marcação em células mucosa para esse anticorpo.

A etiologia das sialadenites não é completamente compreendida, mas é provável que envolva uma combinação de diversos fatores etiológicos que contribuem para a redução do fluxo salivar (Gomes *et al.* 2006). A maioria dos trabalhos publicados na literatura foram realizados principalmente na glândula parótida (Terry *et al.* 1991; Williams *et al.*1998); seguido em menor número pela glândula submandibular (Gottesman *et al.* 1996, Léon *et al.* 2008) e nenhum estudo relacionado á glândula sublingual. Alguns fatores sistêmicos podem predispor o paciente a um quadro inflamatório das glândulas salivares, como por exemplo, pacientes em estado de imunossupressão, como diabetes, alcoolismo, desordens auto-imunes como a Síndrome de Sjogren, diminuição do fluxo salivar secundária a medicamentos (antidepressivos, anticolinérgicos e diuréticos) (Nusem-Horowitz 1995, Matsuo *et al.*1997). A sialadenite aguda é mais comum na glândula parótida, sendo bilateral em 10 a 25% dos casos, sendo primeiramente afetada (Tukutuku *et al.* 1990; Mulligan *et al.* 2000). No entanto, existem dados demonstrando que o aumento de volume da glândula submandibular é maior quando comparado ao da glândula parótida na AIDS e em pacientes HIV+ (Matee *et al.* 2000). Nesses estudos a glândula sublingual não foi avaliada, provavelmente pela ausência de sinais e sintomas clínicos. Vargas *et al.* (2003) em estudo de 100 glândulas parótidas de pacientes autopsiados com AIDS, encontraram 29 casos de sialadenites apresentando infiltrado discreto, moderado e intenso em 66, 10 e 24%, respectivamente. Já Léon *et al.* (2008) encontraram 25 casos de sialadenite em 102 glândulas submandibulares e em 25 casos nas glândulas sublinguais de 92 pacientes autopsiados com AIDS. Léon *et al.* (2008) encontrou também 12 e 6 casos de sialadenite granulomatosa associadas à co-infecções nas glândulas submandibular e sublingual, respectivamente.

Estudamos 10 casos de sialadenite para cada glândula salivar maior de pacientes autopsiados com AIDS em fase avançada, no entanto, não encontramos significância em nenhuma das três glândulas estudadas. Até o momento não há trabalho na literatura da língua inglesa mostrando a expressão de PLUNC nas sialadenites. Bartlett *et al.* (2008) mostrou a expressão de PLUNC em lisados de polimorfonucleares por western blot porém não evidenciamos nenhuma célula inflamatória positiva para os anticorpos de PLUNC.

Com o advento da AIDS é comum encontrar infecções bacterianas, fúngicas e virais associadas à sialadenites. Santiago *et al.* (2000) diagnosticou através da PAAF um caso de infecção por CMV associado a sialadenite em paciente HIV+. A presença do CMV em indivíduos infectados pelo HIV é comum, e a predileção pelas glândulas salivares é conhecida (Klatt & Shibata, 1988). O CMV foi detectado primeiramente nas células acinares da glândula submandibular de um paciente com AIDS por Pialoux *et al.* (1991) e por Schlleberg *et al.* (1994). Wagner *et al.* (1996) detectaram CMV em 10 de 60 casos das glândulas submandibulares de pacientes autopsiados com AIDS, sendo observado inclusões intracelular nas células ductais e acinares. Embora as glândulas salivares maiores sejam protegidas de agentes infecciosos pela síntese de certos peptídeos como SLIP, beta defensinas, aglutininas, trombospodin e mucinas, mesmo em estados de imunossupressão (Quinones-Mateu *et al.* 2003; Lin *et al.* 2004) a predileção do CMV por estas glândulas é conhecida. Provavelmente características inerentes a este tecido glandular aquelas próprias do CMV estejam influenciado esses achados, conforme mostra observações de interações entre o EGFR do epitélio glandular e a Gb do CMV usando como via de entrada do vírus nessas células (Wang *et al.* 2003). Recentemente foi demonstrado por Rocha *et al.*(2008) que a infecção por CMV aumenta a secreção de SLIP nas glândulas submandibulares de pacientes com AIDS e que pode estar associada com diferentes eventos tais como a proteção contra a infecção, ação de proteinases derivadas das células inflamatórias, além de promoção de reparo tecidual. O presente estudo mostrou maior expressão das proteínas PLUNC em volta da lesão quando comparada com áreas na periferia da lesão de CMV. Embora as áreas marcadas próxima a infecção sejam menores quando comparada com as áreas da periferia, a intensidade de marcação foi maior. O CMV infecta principalmente

ductos, e não provoca uma reação granulomatosa, isso talvez ajude a justificar a maior área corada na periferia. Este achado pode ser sugestivo da função de PLUNC na proteção contra infecção. Esse é o primeiro trabalho mostrando a expressão de PLUNC em infecções pelo CMV. De acordo com Bingle & Craven (2002) e LeClair (2003) as proteínas da família PLUNC, assim como outras moléculas de imunidade inata (BPI, LBP), possuem potenciais receptores de lipopolissacarídeos (LPS), sendo assim, as proteínas LPLUNC podem atuar de modo similar a LBP, tendo uma função pró-inflamatória (Bingle & Craven 2004) apresentando moléculas microbianas à via CD14/receptores toll-like(TLR) 2 ou TLR-4, envolvendo outras vias de TLRs ou ainda sinalizando outras vias desconhecidas. Em contrapartida, a SPLUNC agiria de forma similar a BPI, tendo uma função antiinflamatória, diminuindo a carga microbiana através da morte celular direta ou do seqüestro de moléculas inflamatórias. Rocha *et al.* (2008) estudando a glândula submandibular de 36 pacientes autopsiados com AIDS, mostrou maior expressão de SLIP nos casos de infecção pelo CMV quando comparado com outros grupos (Controle, sialadenite e micobacteriose). PLUNC parece ter a mesma função de SLIP protegendo a glândula contra infecção. No entanto, novos estudos são necessários para o melhor entendimento da expressão de SPLUNC2 frente a infecções secundária inerentes ao HIV.

A tuberculose é uma das infecções oportunistas mais importantes em indivíduos infectados pelo HIV (Cantweel *et al.* 1994). O aumento da incidência está associado a uma terapêutica ineficaz nos pacientes com AIDS e devido a interações com medicamentos antiretrovirais (Small *et al.* 1991; Jerant *et al.* 2000). Os pacientes com acometimento glandular, não apresentam sintomas específicos de tuberculose, principalmente na ausência de história de tuberculose pulmonar, mostrando-se clinicamente como uma tumefação (Comeche Cerveron *et al.* 1995). Padrão histológico reflete a integridade da imunidade celular dos pacientes (Lewin-Smith *et al.* 1998). No nosso estudo todos os pacientes apresentavam nível baixo de CD4. Dentre as glândulas salivares maiores, a parótida é o local mais comumente acometido por *Mycobacterium tuberculosis* (Mullins *et al.* 2000), enquanto outros autores acreditam que a glândula parótida seja a mais acometida (Sanchez *et al.* 1993). Léon *et al.* (2008) afirmaram que tanto a glândula submandibular quanto a sublingual são afetadas quase que similarmente por micobacteriose disseminada, apesar da

não existência de linfonodos intraglandulares, os quais são locais preferencialmente acometidos. A via de infecção é incerta, porém Léon *et al.*(2008) acreditam que possa ser decorrente da disseminação sanguínea, transmissão retrógrada através do ducto excretor ou passagem facilitada através da mucosa subjacente alterada por infecção oportunistas. Nossos achados mostraram maior expressão de SPLUNC2 nas regiões próximas à lesão de micobacteriose. Talvez isso seja justificado devido à expressão de PLUNC ter sido negativo na área de granuloma, a qual é rica em necrose caseosa, o que favorece maior área corada no ácinos que estão mais distante da lesão, que foi considerado por nós periferia de lesão. A função de PLUNC ainda é incerta, porém devido à superexpressão de PLUNC em epitélios expostos a injúrias, pode ser sugerido que essas proteínas são secretadas como produtos com papel defensivo ou protetor (Bingle & Craven, 2003). Esses achados nos permitem especular que PLUNC esteja realmente relacionada com o sistema imune inato protegendo assim as células de origem epitelial contra infecções. Bingle & Craven (2004) sugeriram que a família de proteínas PLUNC tenha função antimicrobiana, interagindo com as membranas bacterianas, talvez devido sua similaridade estrutural com BPI e LPS. Quando comparamos as áreas de periferia das infecções pelo CMV e pelo MTB, o que observamos é maior área corada nas infecções pelo CMV, isso talvez seja justificado pela não formação de reação granulomatosa provocada pelo CMV que infecta principalmente ductos.

A criptococose é uma infecção fúngica que constitui a principal causa de morbidade em 5 a 10% dos pacientes com AIDS (Vecchiarelli *et al.*1998), constitui a principal causa de morte. Alguns autores relataram lesões de criptococose em gengiva e palato de pacientes soropositivos (Glick *et al.* 1987, Schimidth-Westhauser *et al.* 1995, de Faria *et al.* 2005). Nas glândulas salivares Vargas *et al.* (2003) reportaram a ocorrência de criptococose na glândula parótida em 3 de 100 pacientes com AIDS autopsiados. Monteil *et al.* (1997) relataram um caso de criptococose disseminada acometendo a glândula parótida e glândulas salivares labial em paciente com AIDS. Nós realizamos reações de imunoistoquímica em 3 casos de criptococose em glândulas salivares, sendo 01 em cada glândula, porém devido a escasso número de casos, não realizamos comparação estatística. O que observamos foi o mesmo padrão de marcação encontrado nas infecções por CMV e MTB.

Realizamos hibridização *in situ* para o RNA mensageiro de SPLUNC2 apenas nos casos do grupo controle, e observamos positividade em todos os casos selecionados. O padrão de marcação em ponto foi visualizado na região perinuclear dos ácinos. Como a HIS é uma técnica mais sensível que a imunohistoquímica, pretendemos realizá-la nos demais grupos do nosso estudo nos próximos meses.

Em conclusão, este é o primeiro trabalho a estudar a expressão das proteínas da família PLUNC nas glândulas salivares maiores de pacientes autopsiados com AIDS na literatura científica mundial. As proteínas da família PLUNC foram expressas nas parótidas, submandibulares e sublinguais dos pacientes com AIDS e sem AIDS. SPLUNC 2 é super expressa nos casos de CMV e micobacteriose. Novos estudos clínicos e laboratoriais (HIS, PCR, ELISA) devem ser realizados para quantificar a presença de PLUNC na saliva e glândulas salivares maiores de pacientes com AIDS para confirmar nossos achados e melhor compreender a função destas proteínas do sistema imune inato no combate ao CMV e micobacteriose.

## 7. CONCLUSÕES

1. Os pacientes autopsiados com AIDS apresentaram profunda imunossupressão [média de 63 cels/ $\mu$ L (-1)] e eram adultos jovens (média de idade = 37 anos). Os pacientes autopsiados HIV- apresentavam média de idade de 61 anos.
2. SPLUNC1 foi expressa nos ácinos mucosos das glândulas submandibulares e sublinguais dos pacientes autopsiados com AIDS e sem AIDS. SPLUNC2 foi expressa nos ácinos serosos das glândulas salivares maiores de pacientes autopsiados com AIDS e sem AIDS. LPLUNC1 foi expresso nos ductos das glândulas salivares maiores dos pacientes autopsiados com AIDS e sem AIDS.
3. Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de SPLUNC1 e entre os diferentes grupos estudados (HIV negativo, HIV sem alterações histológicas nas glândulas salivares maiores, micobacteriose, citomegalovirose e sialadenite crônica).
4. Houve maior expressão de SPLUNC 2 (estatisticamente significativa) nos ácinos que circundavam as lesões de micobacteriose e citomegalovirose.
5. A técnica de hibridização *in situ* realizada para detectar SPLUNC2 nos pacientes HIV negativos deve ser realizada nos demais grupos deste estudo, principalmente CMV e micobacteriose, para compararmos o padrão de marcação perinuclear de SPLUNC2 encontrado no grupo controle e realizarmos a quantificação destas reações de HIS

## REFERENCIAS

- Abas AK, Lichtman AH, Pober JS. Imunidade Inata. In: Imunologia celular e molecular. 4.ed. Revinter. Rio de Janeiro p. 270-290.
- Alcure ML, Hipólito Junior, OD, Almeida OP, Bonilha H, Lopes MA. Oral Histoplasmosis in na HIV-negative patient. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 101 (2): E33-E36.
- Amim MA; Bailey BMW; PATEL SR. Clinical and radiological evidence to support superficial parotidectomy as the treatment of choice parotid sialadenitis: a retrospective study. *Brit. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2001;39 (2): 348-352.
- Archibald DW, Cole GA. In vitro inhibition of HIV-1 infectivity by human saliva. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1990; 79 (9): 1250-1255.
- Barret-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeye MT, Chamaret S, Gruest J *et al.* Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220(4599): 868-71.
- Bartlett JA, Hicks BJ, Schlomann JM, Ramachandran S, Nauseef WM, McCray PB Jr. PLUNC is a secreted product of neutrophil granules. *J Leukoc Biol.* 2008; 83 (5): 1201-1206.
- Basu D, Williams FM, Ahn CH, Reveille JD. Changing spectrum of the diffuse infiltrative lymphocytosis syndrome. *Arthritis Rheum.* 2006; 55 (3): 466-472.
- Bergey EJ, Cho MI, Hammarskjold ML, Rekosh D, Levine MJ, Blumberg BM, *et al.* Aggregation of human immunodeficiency virus type 1 by human salivary secretion. *Crit Rev Oral Biol Mod.* 1993; 4 (3-4): 467-474.
- Bicanic T, Wood R, Meintjes G, Ribe K, Brauwer A, Loyse A, *et al.* High-dose Amphoterecin B with Flucytosine for the treatment of cryptococcal meningitis in HIV-infected patient: a randomized trial. *Clin Infect Dis.* 2008; 47 (1): 123-130.
- Bingle CD, Bingle L. Characterization of the human PLUNC gene, a gene product with an upper airways and nasopharygeal restricted expression pattern. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1493(3): 363-7.

Bingle CD, Craven J. PLUNC: A novel family of candidate host defense proteins expressed in the upper airways and nasopharynx. *Hum Mol Genet.* 2002; 11(8): 932-943.

Bingle CD, Craven CJ. Comparative analysis of the PLUNC (palate, lung and nasal epithelium clone) protein families. *Biochem Soc Trans.* 2003; 31 (Pt 4): 806-809.

Bingle CD, LeClair EE, Havard S, Bingle L, Gillingham, Craven CJ. Phylogenetic and evolutionary analysis of the PLUNC gene family. *Protein Sci.* 2004; 13 (2): 422-430.

Bingle CD, Craven J. Meet the relatives: a family of BPI-and LBP-related proteins. *Trends Immunol.* 2004; 25 (2): 53-55.

Bingle L, Barnes FA, Cross SS, Rassl D, Wallace WA, Campos MA, Bingle CD. Differential epithelial expression of the putative innate immune molecule SPLUNC1 in cystic fibrosis. *Respir Res.* 2007; 78-79.

Bradshaw J. Cationic antimicrobial peptides: issues for potential clinical use. *Bio Drugs.* 2003; 17 (4): 233-240.

Branger J, Leemans JC, Florquin S, Weijer S. Toll-like receptor 4 plays a protective role in pulmonary tuberculosis in mice. *Int Immunol* 2004; 16 (3): 509-16.

Cadogan M, Dalgleish A. HIV immunopathogenesis and strategies for intervention. *Lancet Infect Dis.* 2008 Sep 23. [Epub ahead of print]

Castle JT, Thompson LD. Kaposi sarcoma of major salivary gland. a clinicopathologic series of six cases. *Cancer* 2000; 88 (1): 15-23.

Cayabyab M, Rohne D, Pollakis G, Messele T, Abebe A, Moghadam-Etmad B, Yang PJ, *et al.* . Rapid CD4+ T-lymphocyte depletion in rhesus monkeys infected with a simian-human immunodeficiency virus expressing the envelope glycoproteins of a primary dual-tropic ethiopian clade c HIV type 1 isolate. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2004; 20(1): 27-40.

Chetty R. Parotid MALT lymphoma in a positive child. Correspondence. *Histopathology* 1996; 29: 195-7.

Chu HW, Thaikootathil J, Rino JG, Zhang G, Wu Q, Moss T, *et al.* Function and regulation of SPLUNC1 protein in *Mycoplasma* infection and allergic inflammation. *J Immunol.* 2007; 179 (6): 3995-4002.

Cleary KB, Batsakis JG. Mycobacterial disease of the head and neck: current perspective. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1995; 104 (10Pt1):107-111.

Clerehugh M, Shearer GM. A TH1 – TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol Today* 1993; 14(3): 107-111.

Clerehugh M, Stocks NI, Zajac RA, Boswell RN, Lucey DR, Via Cs, et al. Detection of three distinct patterns of T helper cell dysfunction in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive patients. Independence of CD4+ cell numbers and clinical staging. *J Clin Invest* 1989; 84(6) 1892-1899.

Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science.* 1995; 270 (5243): 1811-1815.

Cole AM, Liao HI, Stuchlik O, Tilan J, Pohl J, Ganz T. Cationic polypeptides are required for antibacterial activity of human airway fluid. *J Immunol.* 2002; 169 (12): 6985-6991.

Comech-Cerverón C, Barona de Guzmán R, Martínez LE. Parotid tuberculosis. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 1995; 46 (5): 387-390.

Correia-Silva JF, Victória JMN, Guimarães ALS, Salomão EU, Abreu MHNG, Bittencourt H, Gomez RS. Cytomegalovirus shedding in the oral cavity of allogeneic haematopoietic stem cell transplant patients. *Oral Dis.* 2007; 13 (2): 163-169.

Cotran RS, Kumar V, Collins T. Doenças da imunidade. In Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Pathologic Basis of Disease* Seven edition. Philadelphia-Elsevier 2005.

Crombie R, Silvestein RL, MacLow C, Pearce SF, Nachman RL, Laurence J. Identification of a CD36-related thrombospondin 1-binding domain in HIV-1 envelope glycoprotein gp120: relationship to HIV-1-specific inhibitory factor in human saliva. *J Exp Med.* 1998; 187 (1): 25-35.

Crump JA, Reller B. Two decades of disseminated tuberculosis at University Medical Center: the expanding role of Mycobacterial blood culture. *Clin Infect Dis.* 2003; 37 (8): 1037-1043.

De Almeida OP, Scully C. Oral lesions in the systemic mycosis. *Curr Opin Dent.* 1991; 1 (4): 423-428.

De Faria PR, Vargas PA, Saldiva PHN, Bohm GM, Mauad T, de Almeida OP. Tongue disease in advanced AIDS. *Oral Dis.* 2005; 11 (2): 72-80.

Del Prete G, De carli M, Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R, Romagnani S. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol.* 1993; 150 (2): 353-60.

DeVries J. The ABC of CMV. *Adv Neonatal Care.* 2007; 7 (5): 248-55.

Di YP, Harper R, Zhao Y, Pahlavan N, Finkbeiner W, Wu R. Molecular cloning and characterization of spurt, a human novel gene that is retinoic acid-inducible and encodes a secretory protein specific in upper respiratory tracts. *J Biol Chem.* 2003; 278 (2): 1165-1173.

Dodson TB, Perrot DH, Leonard MS. Nonhealing ulceration of oral mucosa. *J Oral Maxillofac Surg.* 1989; 47 (8): 849-852.

Drut R, Anderson V, Greco MA, Gutierrez C, de Leon-Bojorge B, Menezes D, *et al.* Opportunistic infections in pediatric HIV infection: a study of 74 autopsy cases from Latin America. The Latin America AIDS Pathology Study Group. *Pediatr Pathol Lab Med.* 1997; 17 (4): 569-576.

Duarte MI, Amato VS, de Paula JG, Uip DE, Boulos M, Amato Neto V. Parotid enlargement due to adenovirus infections in patient with human immunodeficiency virus infection. *Rev Soc Bras Med Trop* 1996; 29 (5): 503-6.

Edgerton M, Koshlukova SE. Salivary histatin 5 and similarities to the other antimicrobial proteins in human saliva. *Adv Dent Res.* 2000; 14: 16-21.

Ellis D, Pfeiffer T. The ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Eur J Epidemiol.* 1992; 8 (3): 321-325.

Ellis GL, Auclair PL. The normal salivary gland. In: Ellis GL, Auclair PL, editor. *Tumors of the salivary gland.* 3<sup>rd</sup>. series. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology; 1995. p.1-26.

Elvira J, Garcia del Rio E, Lopez-Suarez A, Garcia-Matos P, Giron JA. Submandibular gland infection by *Mycobacterium avium-intracellulare* in a AIDS patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17(7): 529-35. *Ibero Am.* 1993; 20 (4): 361-367.

Esteban Sanchez T, Redondo Lucianez ER, Perez Martinez F, Rodriguez Herrero D, Galindo Leon A, Calero del Castilho JB. Tuberculosis of the parotid glands. *An Otorrinolaringol Ibero Am* 1993; 20 (4): 361-367.

Eza D, Cerrillo G, Moore DAJ, Castro C, Ticona E, Morales D *et al.* Postmortem findings and opportunistic infections in HIV-positive patients from a public hospital in Peru. *Pathol Res Paract* 2006; 202 (11): 767-775.

Ferrerira OG, Cardoso SV, Borges AS, Ferreira MS, Loyola AM. Oral histoplasmosis in Brazil. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Oral Endod* 2002; 93 (6): 654-659.

Fowler CB, Nelson JF, Henley DW, Smith BR. Acquired immune deficiency syndrome presenting as a palatal perforation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1989; 67 (3): 313-318.

Frankel AD, Young JAT. HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 1-25.

Franken C, Meijer CJ, Dijkman JH. Tissue distribution of antileukoprotease and lysozyme in humans. *J Histochem Cytochem.* 1989; 37 (4): 493-498.

Frech AL, Benator DA, Gordin FM. Nontuberculous mycobacterium infection. *Med Clin North Am.* 1997; 81 (2): 361-379.

Fox PC, Wolff A, Yeh CK, Atkinson JC, Baum BJ. Saliva inhibits HIV-1 infectivity. *J Am Dent Assoc.* 1988; 116 (6): 635-637.

Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev immunol.* 2003; 3 (9): 710-720.

Geetha C, Venkatesh SG, Binle L, Bingle CD, Gorr SU. Design and validation of anti-inflammatory peptides from human parotid secretory protein. *J Dent Res.* 2005; 84 (2): 149-153.

Geijtenbeek TB, van Kooyk. DC-SIGN: a novel HIV receptor on DCs that mediates HIV-1 transmission. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2003; 276: 31-54.

Geijtenbeek TB, Know DS, Torensma R, van Vileit SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, *et al.* DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1 binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell.* 2000; 100 (5): 587-597.

Gelfand MS, Cleveland KO, Lancaster D, Corbert CE, Florendo NT. Adenovirus parotitis in patients with AIDS. *Clin Infect Dis* 1994; 19 (6): 1045-8.

Ghafouri B, Kihlström E, Ståhlbom B, Tagesson C, Lindahl M. PLUNC (palate, lung and nasal epithelial clone) proteins in human nasal lavage fluid. *Biochem Soc Trans.* 2003; 31 (Pt 4) :810- 814.

Girard MP. Development of an AIDS vaccine: status report. *Med Trop (mars).* 2007; 67 (4): 340-346.

Gittenger FS, Raible A, Kempf VAJ. Non-tuberculosis mycobacterial infection of the parotid gland in an immunosuppressed adult. *J Med Microbiol.* 2008; 57 (Pt4): 536-539.

Glick M, Cohen SG, Cheney RT, Crooks GW, Greeberg MS. Oral manifestations of disseminated *Cryptococcus neoformans* in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1987; 64 (4): 454-459.

Gomes RT, Naves MD, Carmo MAV, Aguiar MCF. Sialoadenites: revisão de literatura sobre a etiologia, o diagnóstico e o tratamento. *Arq Odont.* 2006; 42 (4): 288-296.

Graziosi C, Pantaleo G, Gantt KR, Fortin JP, Demarest JF, Cohen OJ, *et al.* Lack of evidence for the dichotomy of TH1 and TH2 predominance in HIV-infected individuals. *Science.* 1994, 265 (5169):248-52.

Greenberg MS, Dubin G, Stewart JC, Cumming CG, MacGregor RR, Friedman HM. Relationship of oral disease to the presence of cytomegalovirus DNA in the saliva of AIDS patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod,* 1995; 79 (2): 175-179.

Greenberg MS, Glick M, Nghiem L, Stewart JC, Hodinka R, Dubin G. Relationship of cytomegalovirus to salivary gland dysfunction in HIV-infected patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1997; 83 (3): 334-339.

Greenspan D, Shirlaw PJ. Management of the oral mucosal lesions seen in association with HIV infection. *Oral Dis.* 1997; 3 Supply 1: S229-234.

Hanekom WA, Chadwick EG, Yogev R. Pneumococcal parotitis in a human immunodeficiency virus-infected child. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14 (112): 1113-4.

Harries AD, Maher D. TB/HIV A clinical manual 1996, disponível em: URL: [http://www.who.int/gtb/publications/tb\\_hiv/](http://www.who.int/gtb/publications/tb_hiv/)

He Y, Zhou G, Zhai Y, Dong X, He F, Yao, K. Association of PLUNC gene polymorphisms with susceptibility to nasopharyngeal carcinoma in a Chinese population. *J Med Genet* 2005; 42 (2) :172–176.

Heinic GS, Greenspan D, MacPhail LA, Stuschke M, Roggendorf M, Schwartz RA, *et al.* Oral *Histoplasma capsulatum* infection in association with HIV infection: a case report. *J Oral Pathol Med* 1992; 21 (2): 85-89.

Hernández SL, López de Blanc AS, Sambuelli RH, Roland H, Cornelli C, Lattanzi V, Carnelli MA. Oral histoplasmosis associated with HIV infection: a comparative study. *J Oral Pathol Med.* 2004; 33 (8): 445-450.

Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RAB. Phylogenetic perspective in innate immunity. *Science* 1999; 284: 1313-1318.

Horsburgh CR Jr, Gettings J, Alexander LN, Lennox JL. Disseminated Mycobacterium avium complex disease among patients infected with human immunodeficiency virus, 1985-2000. *Clin Infect Dis.* 2001; 33 (11): 1938-1943.

Hsiao CH, Huang SH, Huang SF, Song CL, Su IJ, Chuang CY, *et al.* Autopsy finding on patients with AIDS in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect.* 1997; 30 (3): 145-159.

Ihrler S, Zietz C, Riederer A, Diebold J, Lohrs U. HIV- related parotid lymphoepithelial cysts. Immunohistochemistry and 3-D reconstruction of surgical and autopsy material with special reference to formal pathogenesis. *Virchows Arch.* 1996; 429 (2-3): 139-147.

Ioachim HL, Ryan JR, Blaugrund SM. Salivary gland lymph nodes: the site of lymphadenopathies and lymphomas associated with human immunodeficiency virus infection. *Arch Pathol Lab Med* 1998; 112 (12): 1224-8.

Itescu S, Brancato LJ, Winchester R. A sicca syndrome in HIV infection: association with HLA-DR5 and lymphocytosis. *Lancet.* 1989; 26 (8661): 466-468.

Itescu S, Brancato LJ, Buxbaum J, Gregersen PK, Rizk CC, Croxson TS, *et al.* A diffuse infiltrative CD8 lymphocytosis syndrome in human immunodeficiency virus infection: a host immune response associated with HLA-DR5. *Ann Intern Med.* 1990; 112 (1): 3-10.

Itescu S, Winchester R. Difuse infiltrative lymphocytosis syndrome: a disorder occurring in human immunodeficiency virus-1 infection that may present as a sicca syndrome. *Rheum Dis Clin North Am.* 1992; 18 (3): 683-697.

Jacob AR, Kuhl M, Wilmanns W, Schalhorn A. Young man with swelling of the left side of the neck and right testis. *Internist (Berl)* 1995; 36 (11): 1080-4.

Janmja AK, Das SK, Kochhar S, Handa U. Tuberculosis of the parotid gland. *Indian J Chest Dis Allied Sci.* 2003; 45(1): 67-69.

Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 197-216.

Jerant AF, Bannon M, Rittenhouse S. Identification and management of tuberculosis. *Am Fam Physician.* 2000; 61 (9): 2667-2678, 2681-2882.

Kaiser A, Weng LP, Brockhaus W, Wunsch PH. Oportunistic infections and HIV-associated malignancies. An evaluation of 58 autopsy case within 10 years. *Med Klin.* 2000; 95 (9):482-486.

Kanas RJ, Jensen JL, Abrma AM, Wuerker RB. Oral mucosal cytomegalovirus as a manifestation of acquired immune deficiency synfrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1987; 64 (2): 183-189.

Kanlarcioğlu AS, Gulenc M, Yucel A, Uzun N, Tasken T, Sakiz D, Altas K. Cryptococcal parotid involvement: an uncommuon localization of *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol.* 2006; 44 (3): 279-283.

Katlama C. Consequences for the management of cytomegalovirus. *AIDS.* 1996; 10 (1): 43-46.

Klatt EC, Shibata D. Cytomegalovirosis infection in the acquired immunodeficiency syndrome. Clinical and autopsy finding. *Arch Pathol Lab Med.* 1988; 112 (5): 540-4.

Klatt EC. Pathology of AIDS. Disponível em [www.medib.med.utah.edu/webPath/AIDS2004](http://www.medib.med.utah.edu/webPath/AIDS2004) [2004 Abr 29].

Klein RS. Prophylaxis of oportunistic infections in individuals infected with HIV. *AIDS.* 1989; 2 Suppl 1: S161-S173.

Knee TS, Ohl CA. Salmonella parotitis with abscess formation in a patient with human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 1009-10.

Kennedy S, Davis C, Abrams WR, Billings PC, Nagashunmugam T, Friedama H, *et al.* Submandibular salivary protease: lack of a role in anti-HIV activity. *J Den Res.* 1998; 77 (7): 1515-1519.

Ko HM, Kim KS, Park JW, Lee YJ, Lee MY, Lee MC, *et al.* Congenital cytomegalovirus infection: three autopsy case report. *J Korean Med Sci* 2000; 15 (3): 337-42.

Kuruvilla A, Humphrey DM, Emko P. Coexistent oral cryptococcosis and Kaposi's sarcoma in acquired immunodeficiency syndrome. *Cutis*. 1992; 49 (4): 260-264.

Kwon-Chung KJ, Sorrell TC, Dromer F, Fung F, Levitz SM. Cryptococcosis: clinical and biological aspect. *Med Mycol*. 2000; 38 Suppl 1: 205-213.

Langford A, Kunze R, Timm H, Ruf B, Reichart P. Cytomegalovirus associated oral ulcerations in HIV-infected patients. *J Oral Pathol Med*. 1990; 19 (2): 71-76.

Larsen K, Madsen LB, Bendixen C. Porcine SLPUNC1: Molecular cloning characterization and expression analysis. *Biochem Biophys Acta*. 2005; 1727 (3): 220-226.

Lawn SD, Checkley A, Wansbrough-Jones MH. Acute bilateral parotitis caused by *Mycobacterium scrofulaceum*: immune reconstitution disease in patient with AIDS. *Sex Transm Infect*. 2005; 81 (6): 517-518.

LeClair EE, Nguyen L, Bingle L, MacGowan A, Singleton V, Ward SJ, Bingle CD. Genomic organization of the mouse PLUNC gene and expression in the developing airways and thymus. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 284 (3): 792-797.

LeClair EE. Four BPI (bactericidal/permeability-increasing protein)-like genes expressed in the mouse nasal, oral, airway and digestive epithelia. *Biochem Soc Trans*. 2003; 31: (Pt 4): 801-805.

Lehner T. Innate and adaptive mucosal immunity in protection against HIV infection. *Vaccine*. 2003; 21 (suppl 2): S68-S76.

Léon JE. Estudo histopatológico, imunohistoquímica e de Hibridização *in situ* das glândulas submandibular e sublingual em pacientes autopsiados com AIDS em fase avançada.[tese]. Piracicaba. FOP/UNICAMP, 2008

Levitz SM. Overview of host defense in fungal infections. *Clin Infect Dis*. 1992; 14 Suppl 1: 37-42.

Lewin-Smith MR, Klasse MK, Frankel SS, Nelson AM. Pathology of human immunodeficiency virus infection: infection conditions. *Ann Diagn Pathol*. 1998; 2 (3): 181-194.

[Lindahl M, Ståhlbom B, Tagesson C](#). Identification of a new potential airway irritation marker, palate lung nasal epithelial clone protein, in human nasal lavage fluid with two-

dimensional electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight. *Electrophoresis*. 2001; 22 (9): 1795- 1800

Lynch DP, Naftolin LZ. Oral *Cryptococcus neoformans* infection in AIDS. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1987; 64 (4): 449-453.

Maggi E, Mazzetti M, Ravina A, Annuziato F, de Carli M, Piccinni MP, *et al*. Ability of HIV to promote a TH1 to TH0 shift and to replicate preferentially in TH2 and TH0 cells. *Science*. 1994; 265 (5169): 244-8.

Malamud D, Friedman HM. HIV in the oral cavity: virus, viral inhibitory activity, and antiviral antibodies: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993; 4 (3-4): 461-466.

Mandel L, Hong J. HIV-associated parotid lymphoepithelial cysts. *J Am Dent Assoc* 1999; 130 (4): 528-32.

Marchevsky A, Rosen MJ, Chrystal G. Pulmonary complications of the acquired immunodeficiency syndrome. *Human Pathol* 1985; 16 (7): 659-70.

Marder MZ, Barr CE, Mandel ID. Cytomegalovirus presence and salivary composition in acquired immunodeficiency syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1985; 60 (4): 352-326.

Maruyama Y, Sameshima H, Kamitomo M, Ibara S, Kaneko M, Ikenoue T, *et al*. Fetal manifestation and poor outcomes of congenital cytomegalovirus infections: possible candidates for intrauterine antiviral treatment. *J Obstet Gynecol Res*. 2007; 33 (5): 619-623.

Matsuo T. Acute suppurative parotitis caused by a fish bone: A case report. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg*. 1997; 26: 54.

McArthur CP, Subtil-DeOliveira A, Palmer D, Fiorella RM, Gustafson S, Tira D *et al*. Characteristics of salivary diffuse infiltrative syndrome in West Africa. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124 (12): 1773-9.

McNeely TB, Dealy M, Drpps DJ, Orenstein JM, Eisenberg SP, Wahl SM. Secretory leukocyte protease inhibitor: a human saliva protein exhibiting anti-human immunodeficiency virus 1 activity in vitro. *J Clin Invest*. 1995; 96 (1): 456-464.

Mello FCQ. Modelos predictivos para o diagnóstico da tuberculose pulmonar. [tese]. Rio de Janeiro. FM/UFRJ, 2001.

Menon R, Bem O, Goulesbrough D, Stracham DR. A clinical review of 128 cases of head and neck tuberculosis presenting over a 10 year period in Bradford, UK. *J Laryngol Otol.* 2007; 121 (4): 362-368.

Minamoto G, Armstrong D. Fungal infections in AIDS: histoplasmosis and coccidioidomycosis. *Infect Dis Clin North Am.* 1988; 2 (2): 447-456.

Ministério da Saúde 2007

<http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMIS1D4E2FEBPTBRIE.htm> acesso em 06/10/08

Mjor IA, Fejerskov O. *Embriologia e Histologia Oral Humana.* Copenhagen: Munksgaard; 1990. p. 243-75.

Monteil RA, Holfman P, Michiels JF, Labouyrie R. Oral cryptococcosis: case report of salivary gland involvement in an AIDS patient. *J Oral Pathol Med* 1997; 26 (1): 53-6.

Moullignier A, Authier FJ, Baudrimont M, Pialoux G, Belec L, Polivka M. *et al.* Peripheral neuropathy in human immunodeficiency virus-infected patients with the diffuse infiltrative lymphocytosis syndrome. *Ann Neurol.* 1997; 41 (4): 438-445.

Moutsopoulos NM, Greenwell-Wild T, Wahl SM. Differential mucosa susceptibility in HIV-1 transmission and infection. *Adv Dent Res.* 2006; 19 (1): 52-56.

Mukherjee A, Silver CE, Rosario PG, Gerst PH, Kaposi's sarcoma of the parotid gland in acquired immunodeficiency syndrome. *Am Surg* 1998; 64 (3): 259-60.

Mullins JE, Ogle O, Cottrel DA. Painless mass in the parotid region. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000; 58 (3): 316-319.

Nagashunmugam T, Friedman HM, Davis C, Kennedy S, Goldstein LT, Malamud D. Human submandibular saliva specifically inhibits HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1997; 13: (5): 371-376.

Nusem-Horowitz S, Wolf M, Coref A. Acute suppurative parotitis and parotid abscess in children. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 1995; 32: 123-126.

Ohtomo K, Wang S, Masunaga A, Aikichi I, Sugawara I. Secondary infections of AIDS autopsy cases in Japan with special emphasis on *Mycobacterium avium-intracellulare complex* infection. *Tohoku J Exp Med.* 2000; 192 (2): 99-109.

Ottaviani F, Galli A, Lucia MB, Ventura G. Bilateral parotid sialolithiasis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome and immunoglobulin G multiple myeloma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1997; 83: 552-4.

Palella Jr FJ, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 1998;338:853–60.

Pialoux G, Ravisse P, Trotor P, Dupont B. Cytomegalovirus infections of the submandibular gland in a patient with AIDS. *Rev Infect Dis* 1991; 13: 338.

Raab SS, Thomas PA, Cohen MB. Fine-needle aspiration biopsy of salivary gland mycoses. *Diagn Cytopathol* 1994; 11 (3): 286-90.

Rana FS; Hawken MP, Mwachari C, Bhatt SM, Abdullah F, Ng'ang'a LW *et al.* Autopsy study of HIV-1-positive and HIV-1-negative adult medical patients in Nairobi, Kenya. *J Acquir Immune Defic Synd* 2000; 24 (1): 23-29.

Rangel AI, Colleta RD, Almeida OP, Graner E, Lucena A, Saldiva PH, *et al.* Parotid mycobacteriosis is frequently caused by *Mycobacterium tuberculosis* in advanced AIDS. *J Oral Pathol Med* 2005; 34 (7): 407-12.

Rhodes RH. Histopathology of the central nervous system in the acquired immunodeficiency syndrome. *Hum Pathol* 1987; 18 : 636-43.

Riveira H, Correa MF, Castillo-Castillo S, Nikitakis NG. Primary oral tuberculosis: a report of a case diagnosed by polymerase chain reaction. *Oral Dis* 2003; 9 (1): 46-8.

Rocha LA, Vargas PA, Silva LFF, Leon JE, Santos AB, Hiemstra OS, *et al.* Expression of secretory leukocyte proteinase inhibitor in the submandibular glands of AIDS patients. *Oral Dis.* 2008; 14 (1): 82-88.

Rodrigues ML, Alviano CS, Travasso LR. Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*: virulence factors and immunological mechanisms. *Microbes Infect.* 1999; 1 (4): 293-301.

Rotterdam H, Sommers SC. Alimentary tract biopsy lesions in the acquired immunodeficiency syndrome. *Pathology* 1985; 17 (2): 181-82.

Saag MS, Cloud GA, Graybill JR, Sobel JD, Tuazon CU, Johnson PC, *et al.* A comparison of itraconazole versus fluconazole as maintenance therapy for AIDS-associated

cryptococcal meningitis. National Institute of Allergy and Infectious Disease Mycoses Study Group. *Clin Infect Dis*. 1999; 28 (2): 291-296.

Santiago K, Riveira A, Cabaniss D, Dhurhar N, Moroz K. Fine-needle aspiration of cytomegalovirus sialadenitis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome: pitfalls of diff-quick staining. *Diagn Cytopathol* 2000; 22 (2): 101-3.

Saunders PR, McPherson DW. Acute suppurative parotitis: A forgotten cause of upper airway obstruction. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol*. 1991; 72: 412-414.

Scully C, Almeida OP, Sposto MR. The deep mycoses in HIV infection. *Oral Dis* 1997; 3 (1) 200-7

Schelleberg DM, Desmod NM, Murphy SM, Tanner AG. AIDS-associated cytomegalovirus infections of the submandibular gland mimicking a tumour. *J Royal Soc Med* 1994; 87(8): 483-4.

Schiødt M, Greenspan D, Daniels TE, Nelson J, Leggott PJ, Wara DW, *et al*. Parotid gland enlargement and xerostomia associated with labial sialadenitis in HIV-infected patients. *J Autoimmun*. 1989; 2 (4): 415-425.

Schmidt-Westhausen A, Grunewald T, Reichart PA, Pohle HD. Oral cryptococcosis in a patient with AIDS. A case report. *Oral Dis*. 1995; 1 (2): 77-79.

Sharp PM, Hahn BH. Prehistory of HIV-1. *Nature*. 2008 455 (2): 605-6.

Shugar JM, Jacobson AL, Ryan JR, Bernard PJ, Dickman SH. Multicentric parotid cysts and cervical adenopathy in AIDS patients. A newly recognized entity: CT and MR manifestation *Laryngoscope*. 1998; 98 (7): 772-775.

Shugars DC, Wahl SM. The role of the oral environment in HIV-1 transmission. *J Am Dent Assoc*. 1998; 129 (7): 772-775.

Singh B, Balwally NA, Har-El G, Lucente FE. Isolated cervical tuberculosis in patients with HIV infection. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1998; 118 (6): 766-70.

Stanley RB, Frenadez JA, Peppard SB. Cervicofacial mycobacterial infections presenting as major salivary gland disease. *Laryngoscope*. 1983; 93 (10): 1271-1275.

Steininger C, Stockl EP, Kraupp TP. Cytomegalovirus disease in the era of highly active antiretroviral therapy (HAART). *J Clin Virol*. 2006; 37 (1): 1-9.

Stoiber H, Pruenster M, Ammann CG, Dierich MP. Complement-opsonized HIV: the free rider on its way to infection. *Mol Immunol*. 2005; 42 (2): 153-160.

Sudharshan S, Biswas J. Introduction and immunopathogenesis of acquired immune deficiency syndrome. *Indian J Ophthalmol*, 2008; 56: 357-62.

Sung YK, Moon C, Yoo JY, Moon C, Pearse D, Pevsner J, Ronnet GV. PLUNC, a member of the secretory gland protein family, is up-regulated in nasal respiratory epithelium after olfactory bulbectomy. *J Biol Chem*. 2002; 277 (15): 12762-12769.

Taher AA. Tuberculosis of the parotid salivary gland – case report. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1988; 26 (6): 514-516.

Tenovou J. Antimicrobial function of human saliva – how important is it for oral health? *Acta Odontol Scand*. 1998; 56 (5): 250-256.

Texereau J, Chiche JD, Taylor W, Choukroun G, Comba B, Mira JP. The importance of Toll-like receptor 2 polymorphisms in severe infections. *Clin Infect Dis* 2005 Nov 15;41 Suppl 7:S408-15.

Tzerbod F, Kabani S, Booth D. Cryptococcosis as an exclusive oral presentation. *J Oral Maxillofac Surg*. 1992; 50 (7): 759-760.

Uccini S, Riva E, Antonelli G, D’Offizi G, Prozzo A, Angelicci A. *et al*. The benign cysts lymphoepithelial lesion of the parotid gland is a viral reservoir in HIV type 1-infected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1999; 10 (15): 1339-44.

UNAIDS AIDS epidemic update, 2007 disponível em [http://www.unaids.org/en/HIV\\_data/2007EpiUpdate/default.asp](http://www.unaids.org/en/HIV_data/2007EpiUpdate/default.asp)

Valle ACF, Moreira LC, Paes RA, Moreira JS, Pizzini CV, Muniz MM, Zancopé-Oliveira RM. Chronic disseminated histoplasmosis with lesion restricted to the mouth: case report. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2006; 48 (2); 113-116.

Vargas PA, Mauad T, Bohm GM, Saldiva PH, Almeida OP. Parotid gland involvement in advanced AIDS. *Oral Dis* 2003; 9 (2): 55-61.

Vecchiarelli A, Retini C, Monari C, Casadevall A. Specific antibody to *Cryptococcus neoformans* alters human leukocyte synthesis and promotes T-cell proliferation. *Infect Immun*. 1998; 66 (3): 1244-1247.

- Veronesi R, Focaccia R, Lomar AV. *Retroviroses HUMAN HIV/AIDS* 1<sup>a</sup> Ed. São Paulo: Ateneu 2000.
- Vitorino R, Lobo MJ, Ferrer-Correira AJ, Dubin JR, Tomer KB *et al.* Identification of human whole saliva protein components using proteomics. *Proteomics*. 2004; 4 (4): 1109-1115.
- Wagner RP, Tian H, McPherson MJ, Latham PS, Orenstein JM. AIDS-associated infections in salivary gland: autopsy survey of 60 cases. *Clin Infect Dis*. 1996; 22 (2): 369-71.
- Wahl SM, Worley P, Jin W, McNeely TB, Eisenberg S, Fasching C, *et al.* Anatomic dissociation between HIV-1 and its endogenous inhibitor in mucosal tissues. *Am J Pathol*. 1997; 150 (4): 1275-1284.
- Wallace M, Bartz SR, Chang WL, Mackenzie DA, Pauza CD, Malkovky M. Gamma delta T lymphocyte responses to HIV. *Clin Exp Immunol*. 1996; 103 (2): 177-184.
- Wang X, Huong SM, Chiu ML, Raab-Traub N, Huang ES. Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature*. 2003; 424 (6947): 456-461.
- Wax TD, Layfield LJ, Zaleski S, Bhargara V, Cohen M, Lysterly HK. *et al.* Cytomegalovirus sialadenitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome: a potential diagnosis pitfall with fine-needle aspiration cytology. *Diagn Cytopathol*. 1994; 10 (2): 169-172.
- Weinberg A, Krisanaprokorkit S, Dali BA. Epithelial antimicrobial peptides: review and significance for oral applications. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998; 9 (4): 399-414.
- Werning IT, Waterhouse JP, Mooney JW. Subacute necrotizing sialadenitis. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol*. 1990; 70: 756-759.
- Weston WM, LeClair EE, Trzyna W, McHunh KM, Nugent P, Lafferty CM, *et al.* Differential display identification of plunc, a novel gene expressed in embryonic palate, nasal epithelium and adult lung. *J Biol Chem* 1999; 274 (19): 13698-703.
- Wheat LJ. Histoplasmosis: a review for clinicians from non-endemic areas. *Mycoses*. 2006; 49 (4): 274-282.

Wheeler TT, Hood K, Oden K, McCracken J, Morris CA. Bovine parotid secretory protein: structure, expression and relatedness to other BPI (bactericidal/permeability-increasing protein)-like proteins. *Biochem Soc Trans.* 2003; 31: (Pt 4): 781-784.

Yeh CK, Fox PC, Fox CH, Travis WD, Lane HC, Baum BJ. Kaposi's sarcoma of the parotid gland in acquired immunodeficiency syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1989; 67 (3): 309-312.

Yssel H, De Wall Malefyt R, Roncarolo MG, Abrams JS, Lahesmaa R, Spits H *et al.* IL-10 is produced by subsets of human CD4+ T cell clones and peripheral blood T cells. *J immunol.* 1992; 149 (7): 2378-84.

Zhou HD, Fan SQ, Zhao J, Huang DH, Zhou M, Liu HY, *et al.* Tissue distribution of the secretory protein, SPLUNC1, in the human fetus. *Histochem Cell Biol.* 2006; 125 (3): 315-324.

## APÊNDICE

**Tabela 02.** Esta tabela descreve os dados pertencentes aos 10 pacientes HIV soronegativos autopsiados, em relação ao sexo, idade, causa morte e principais achados na Folha Frontal Padrão, dos quais a glândula parótida foi dissecada e utilizada na presente pesquisa.

<b>Registro</b>	<b>Gênero</b>	<b>Idade</b>	<b>Causa Mortis</b>	<b>Principais achados</b>
Caso 01	M	61	Bronquite catarral	Diabetes Mellitus tipo II; Aterosclerose; Hipertensão arterial
Caso 02	M	Desconhecida	Edema Cerebral	Aneurisma da artéria cerebral média à esquerda
Caso 03	M	57	Acidente vascular cerebral	Arteriosclerose sistêmica, Senescência
Caso 04	M	67	Choque séptico	Vasculite sistêmica; Pneumonia por <i>P. Carinii</i> e citomegalovírus, Corticoterapia
Caso 05	F	77	Acidente vascular cerebral	Acidente Vascular Cerebral Hemorrágico; Aterosclerose (AVCH)
Caso 06	M	45	Choque séptico	Transplante renal; Hemorragia
Caso 07	M	51	Choque séptico	Gota; Pioartrite; Diabetes Mellitus
Caso 08	F	49	Pancreatite aguda	Miastenia gravis; Pancreatite aguda
Caso 09	F	66	Dano alveolar difuso	Arteriosclerose sistêmica
Caso 10	M	70	Neoplasia maligna de órbita	Neoplasia maligna de órbita, necrose tubular sistêmica

**Tabela 03.** Esta tabela descreve os dados pertencentes aos 10 pacientes HIV soronegativos autopsiados, em relação ao sexo, idade, causa morte e principais achados na Folha Frontal Padrão, dos quais a glândula submandibular foi dissecada e utilizada na presente pesquisa.

<b>Registro</b>	<b>Gênero</b>	<b>Idade</b>	<b>Causa Mortis</b>	<b>Principais achados</b>
Caso 01	F	Desconhecida	Tromboembolismo	Doença de Chagas; Aterosclerose
Caso 02	M	67	Choque séptico	Hiperplasia prostática benigna; Infecção do trato respiratório
Caso 03	M	61	Bronquite catarral	Diabetes Melittus tipo II; Aterosclerose; Hipertensão arterial
Caso 04	M	Desconhecida	Edema Cerebral	Aneurisma da artéria cerebral média à esquerda
Caso 05	M	57	Acidente vascular cerebral	Arteriosclerose sistêmica, Senescência
Caso 06	M	65	Tromboembolismo pulmonar	Arteriosclerose sistêmica; Aneurisma da aorta abdominal infrarenal
Caso 07	M	67	Choque séptico	Vasculite sistêmica; Pneumonia por <i>P.</i> <i>Carinii</i> , citomegalovírus e Corticoterapia
Caso 08	F	77	Acidente vascular cerebral	AVCH; Aterosclerose
Caso 09	M	45	Choque séptico	Transplante renal; Hemorragia
Caso 10	F	66	Dano alveolar difuso	Arteriosclerose sistêmica

**Tabela 04.** Esta tabela descreve os dados pertencentes aos 10 pacientes HIV soronegativos autopsiados, em relação ao sexo, idade, causa morte e principais achados na Folha Frontal Padrão, dos quais a glândula sublingual foi dissecada e utilizada na presente pesquisa.

<b>Registro</b>	<b>Gênero</b>	<b>Idade</b>	<b>Causa Mortis</b>	<b>Principais achados</b>
Caso 01	M	61	Bronquite catarral	Diabetes Mellitus tipo II; Aterosclerose; Hipertensão arterial
Caso 02	M	Desconhecida	Edema Cerebral	Aneurisma da artéria cerebral média à esquerda
Caso 03	M	57	Acidente vascular cerebral	Arteriosclerose sistêmica, Senescência
Caso 04	M	65	Tromboembolismo pulmonar	Arteriosclerose sistêmica; Aneurisma da aorta abdominal infrarenal
Caso 05	F	77	Acidente vascular cerebral	AVCH; Aterosclerose
Caso 06	M	56	Meningite Purulenta	Hipertensão arterial sistêmica; AVCH; Neoplasia maligna em fossa ilíaca esquerda
Caso 07	M	45	Choque séptico	Transplante renal; Hemorragia
Caso 08	M	51	Choque séptico	Gota; Piorrite; Diabetes Mellitus
Caso 09	F	49	Pancreatite aguda	Miastenia gravis; Pancreatite aguda
Caso 10	F	66	Dano alveolar difuso	Arteriosclerose sistêmica

**Tabela 05.** Dados dos 35 pacientes autopsiados com AIDS com relação ao gênero, idade, causa morte e principais achados na Folha Frontal Padrão, dos quais a glândula parótida foi dissecada e utilizada na presente pesquisa.

<b>Registro</b>	<b>Gênero</b>	<b>Idade</b>	<b>Causa Mortis</b>	<b>Principais achados</b>
Caso 01	F	23	Neurocriptococose	Neurocriptococose; Pancreatite aguda
Caso 02	M	46	Micobacteriose miliar	Micobacteriose miliar
Caso 03	M	65	Broncopneumonia	Micobacteriose pleural
Caso 04	M	41	Broncopneumonia; Micobacteriose miliar	Micobacteriose miliar; Broncopneumonia bilateral
Caso 05	M	40	Micobacteriose pulmonar	Pneumonia por CMV; Meningite por <i>Cryptococcus neoformans</i>
Caso 06	M	32	Doença granulomatosa	Doença Granulomatosa (pulmão, baço); Desnutrição
Caso 07	M	33	Micobacteriose pulmonar	Pneumocistose pulmonar; Pancreatite crônica
Caso 08	M	30	Micobacteriose miliar	Micobacteriose miliar
Caso 09	M	24	Micobacteriose miliar	Micobacteriose miliar
Caso 10	M	30	Síndrome da Angústia respiratória	Micobacteriose pulmonar, neurotoxoplasmose
Caso 11	F	30	Choque cardiogênico	Insuficiência cardíaca congestiva; derrame pleural
Caso 12	F	30	Neurotoxoplasmose	Micobacteriose ganglionar; neurotoxoplasmose
Caso 13	M	69	Tuberculose miliar	Tuberculose miliar; úlceras esofágicas

Caso 14	M	44	Choque séptico	Choque séptico; pneumonia por <i>Pneumocystis carinii</i> tratada
Caso 15	F	38	Pneumonia bilateral	Micobacteriose pulmonar tratada; pneumonia bilateral
Caso 16	M	15	Aspergilose disseminada	Aspergilose disseminada
Caso 17	F	37	Pneumonia	Pneumonia, caquexia
Caso 18	F	29	Micobacteriose disseminada	Micobacteriose disseminada; choque séptico
Caso 19	F	26	Neurotoxoplasmose	Micobacteriose; CMV
Caso 20	F	36	Edema cerebral	Neurotoxoplasmose; CMV; broncopneumonia
Caso 21	M	52	Choque séptico	Broncopneumonia; micobacteriose disseminada, CMV
Caso 22	M	29	Insuficiência respiratória	Broncopneumonia; micobacteriose disseminada, CMV
Caso 23	M	33	Criptococose disseminada	Criptococose disseminada
Caso 24	F	29	Choque séptico	Choque séptico, candidose esofágica
Caso 25	M	42	Choque séptico	Choque séptico; neurocriptococose; pioartrite
Caso 26	F	47	Choque séptico	Broncopneumonia; choque séptico; meningite
Caso 27	M	43	Choque séptico	Micobacteriose disseminada
Caso 28	M	32	Choque séptico	Choque séptico; pneumonia; herpes genital

Caso 29	M	50	Choque séptico	Broncopneumonia; neurocriptococose; linfadenomegalia mesentérica
Caso 30	M	26	Pneumocistose	Pneumocistose; CMV; micobacteriose; caquexia
Caso 31	M	51	Broncopneumonia	Broncopneumonia, SARA, candidose oral e esofagiana; CMV; Choque séptico
Caso 32	M	44	Choque séptico	LNH de células B disseminado; candidose esofagiana
Caso 33	F	25	Choque séptico	Choque séptico; pneumocistose; toxoplasmose, CMV
Caso 34	M	46	Micobacteriose disseminada	Micobacteriose disseminada, Histoplasmosse disseminada
Caso 35	M	27	Broncopneumonia	Broncopneumonia, esofagite

**Tabela 06.** Dados dos 38 pacientes autopsiados com AIDS com relação ao gênero, idade, causa morte e principais achados na Folha Frontal Padrão, dos quais a glândula submandibular foi dissecada e utilizada na presente pesquisa.

<b>Registro</b>	<b>Gênero</b>	<b>Idade</b>	<b>Causa Mortis</b>	<b>Principais achados</b>
Caso 01	F	33	Choque séptico	Caquexia; empiema e derrame pleural, gastrite por CMV
Caso 02	M	46	Micobacteriose miliar	Micobacteriose miliar
Caso 03	F	34	Micobacteriose miliar	Micobacteriose miliar
Caso 04	M	65	Broncopneumonia	Micobacteriose pleural
Caso 05	F	40	Septicemia	Micobacteriose miliar; caquexia; derrame pleural; ascite purulenta

Caso 06	M	47	Insuficiência respiratória	Broncopneumonia; esplenite aguda
Caso 07	M	40	Micobacteriose pulmonar	Pneumonia por CMV; Meningite por <i>Cryptococcus neoformans</i>
Caso 08	M	33	Micobacteriose pulmonar	Pneumocistose pulmonar; Pancreatite crônica
Caso 09	M	24	Micobacteriose miliar	Micobacteriose miliar
Caso 10	F	48	Choque séptico	Pneumonia associada ao HIV
Caso 11	F	22	Micobacteriose	Micobacteriose pulmonar; neurotoxoplasmose
Caso 12	M	40	Pneumonia por sarampo	Caquexia; infecções oportunistas
Caso 13	M	44	Choque séptico	Choque séptico; pneumonia por <i>Pneumocystis carinii</i> tratada
Caso 14	M	38	Pneumonia bacteriana (gram +)	Candidose oral; caquexia; condiloma acuminado no pênis
Caso 15	F	30	Choque séptico	Herpes zoster disseminada; micobacteriose atípica disseminada
Caso 16	F	50	Choque séptico	Choque séptico
Caso 17	F	37	Pneumonia	Pneumonia, caquexia
Caso 18	M	35	Choque hipovolêmico	Pneumocistose; derrame pleural
Caso 19	M	24	Hipertensão intracraniana	Neurotoxoplasmose; micobacteriose disseminada; pneumocistose

Caso 20	F	26	Neurotoxoplasmose	Tuberculose; CMV
Caso 21	M	29	Insuficiência respiratória	Broncopneumonia; micobacteriose disseminada, CMV
Caso 22	M	33	Criptococose disseminada	Criptococose disseminada
Caso 23	F	47	Choque séptico	Broncopneumonia; choque séptico; meningite
Caso 24	M	43	Choque séptico	Micobacteriose disseminada
Caso 25	M	39	Pneumonia intersticial	Histoplasmose pulmonar; herpes zoster disseminada; sarcoma de Kaposi gástrico
Caso 26	M	32	Choque séptico	Choque séptico; pneumonia; herpes genital
Caso 27	M	50	Choque séptico	Broncopneumonia; neurocriptococose; linfadenomegalia mesentérica
Caso 28	M	26	Pneumocistose	Pneumocistose; CMV; micobacteriose; caquexia
Caso 29	M	26	Insuficiência respiratória	Pneumonia intersticial; derrame pleural; micobacteriose ganglionar
Caso 30	M	51	Broncopneumonia	Broncopneumonia, SARA, candidose oral e esofagiana; CMV; Choque séptico
Caso 31	M	29	Choque séptico	Choque séptico, Tuberculose disseminada
Caso 32	F	28	Choque séptico	Derrame pleural
Caso 33	M	44	Choque séptico	LNH de células B disseminado; candidose esofageana

Caso 34	M	51	Insuficiência respiratória aguda	Caquexia, CMV
Caso 35	F	25	Choque séptico	Choque séptico; pneumocistose; toxoplasmose, CMV
Caso 36	F	36	Pneumocistose	Pneumocistose; candidose esofágica
Caso 37	M	46	Micobacteriose disseminada	Micobacteriose disseminada, Histoplasmosse disseminada
Caso 38	M	32	Insuficiência respiratória	Meningite, hemorragia pulmonar

**Tabela 07.** Dados dos 27 pacientes autopsiados com AIDS com relação ao gênero, idade, causa morte e principais achados na Folha Frontal Padrão, dos quais a glândula sublingual foi dissecada e utilizada na presente pesquisa.

<b>Registro</b>	<b>Gênero</b>	<b>Idade</b>	<b>Causa Mortis</b>	<b>Principais achados</b>
Caso 01	F	33	Choque séptico	Caquexia; empiema e derrame pleural, gastrite por CMV
Caso 02	F	23	Neurocriptococose	Neurocriptococose; Pancreatite aguda
Caso 03	F	66	Neurocriptococose	Criptococose disseminada
Caso 04	F	34	Micobacteriose miliar	Micobacteriose miliar
Caso 05	M	65	Broncopneumonia	Micobacteriose pleural
Caso 06	M	47	Insuficiência respiratória	Broncopneumonia; esplenite aguda
Caso 07	F	47	Micobacteriose	Micobacteriose; meningioma

Caso 08	M	30	Síndrome da angustia respiratória (SARA)	Micobacteriose pulmonar; neurotoxoplasmose
Caso 09	F	48	Choque séptico	Pneumonia associada ao HIV
Caso 10	M	38	Pneumonia bacteriana (Gram +)	Candidose oral; caquexia; condiloma acuminado no pênis
Caso 11	F	37	Pneumonia	Pneumonia, caquexia
Caso 12	M	38	Insuficiência respiratória	Neurotoxoplasmose; broncopneumonia, CMV
Caso 13	F	29	Micobacteriose disseminada	Micobacteriose disseminada; choque séptico
Caso 14	F	29	Choque séptico	Choque séptico, candidose esofagiana
Caso 15	M	32	Broncopneumonia	Broncopneumonia
Caso 16	M	40	Choque séptico	Broncopneumonia; meningite
Caso 17	M	62	Pancreatite aguda	Pancreatite aguda; Hemorragia pulmonar
Caso 18	M	43	Choque séptico	Micobacteriose disseminada
Caso 19	M	50	Choque séptico	Broncopneumonia; neurocriptococose; linfadenomegalia mesentérica
Caso 20	M	26	Pneumocistose	Pneumocistose; CMV; micobacteriose; caquexia
Caso 21	M	44	Hemorragia digestiva	LNH gástrico; lipoidose da aorta
Caso 22	F	28	Choque séptico	Derrame pleural

Caso 23	M	34	Choque séptico	Histoplasmose disseminada
Caso 24	F	39	Micobacteriose disseminada	Micobacteriose miliar; caquexia
Caso 25	M	51	Insuficiência respiratória aguda	Caquexia, CMV
Caso 26	F	36	Pneumocistose	Pneumocistose; candidose esofagiana
Caso 27	M	27	Broncopneumonia	Broncopneumonia, esofagite

**Tabela 08.** Análise da imunofenotipagem de linfócitos de 44 pacientes HIV positivos pelo Método de Citometria de Fluxo. Entre parênteses está o número de dias após a imunofenotipagem até a realização da autópsia.. Em 19 casos, o exame não foi realizado.

Registro	CD4 absoluto*	CD8**	Razão CD4/CD8	Data do exame	Data da autópsia
Caso 01	26 cels/ $\mu$ L	124 cels/ $\mu$ L	0,21	19/09/1996	20/09/1996 (1 dia)
Caso 02	06 cels/ $\mu$ L	234 cels/ $\mu$ L	0,03	04/09/1996	21/09/1996 (17 dias)
Caso 03	40 cels/ $\mu$ L	1623 cels/ $\mu$ L	0,02	01/07/1996	21/09/1996 (82 dias)
Caso 04	50 cels/ $\mu$ L	134 cels/ $\mu$ L	0,37	19/09/1996	23/09/1996 (05 dias)
Caso 05	93 cels/ $\mu$ L	1698 cels/ $\mu$ L	0,05	21/10/1996	28/11/1996 (38 dias)
Caso 06	13 cels/ $\mu$ L	318 cels/ $\mu$ L	0,04	11/12/1996	17/12/1996 (06dias)
Caso 07	41 cels/ $\mu$ L	1090 cels/ $\mu$ L	0,04	20/01/1996	25/01/1997 (371 dias)
Caso 08	71 cels/ $\mu$ L	2282 cels/ $\mu$ L	0,03	18/12/1996	03/02/1997 (47 dias)

Caso 09	05 cels/ $\mu$ L	387 cels/ $\mu$ L	0,01	19/12/1996	17/03/1997 (88 dias)
Caso 10	13 cels/ $\mu$ L	56 cels/ $\mu$ L	0,24	21/02/1997	24/03/1997
Caso 11	22 cels/ $\mu$ L	917 cels/ $\mu$ L	0,02	08/10/1996	24/03/1997
Caso 12	67 cels/ $\mu$ L	937 cels/ $\mu$ L	0,07	23/01/1997	04/04/1997 (71 dias)
Caso 13	11 cels/ $\mu$ L	447 cels/ $\mu$ L	0,02	31/10/1996	10/04/1997 (161 dias)
Caso 14	585 cels/ $\mu$ L	673 cels/ $\mu$ L	0,87	09/04/1997	15/04/1997 (04 dias)
Caso 15	34 cels/ $\mu$ L	364 cels/ $\mu$ L	0,09	18/04/1997	22/04/1997 (04 dias)
Caso 16	134 cels/ $\mu$ L	279 cels/ $\mu$ L	0,48	30/07/1997	04/05/1997 (04 dias)
Caso 17	0 cels/ $\mu$ L	128 cels/ $\mu$ L	0	29/01/1997	05/05/1997 (96 dias)
Caso 18	45 cels/ $\mu$ L	123 cels/ $\mu$ L	37	04/02/1997	06/05/1997 (91 dias)
Caso 19	35 cels/ $\mu$ L	228 cels/ $\mu$ L	0,15	20/02/1997	12/05/1997 (81 dias)
Caso 20	47 cels/ $\mu$ L	348 cels/ $\mu$ L	0,13	02/04/1997	14/05/1997 (39 dias)
Caso 21	12 cels/ $\mu$ L	948 cels/ $\mu$ L	0,01	29/04/1997	17/05/1997 (18 dias)
Caso 22	05 cels/ $\mu$ L	317 cels/ $\mu$ L	0,02	28/04/1997	28/05/1997 (30 dias)
Caso 23	74 cels/ $\mu$ L	755 cels/ $\mu$ L	0,1	18/07/1997	01/08/1997 (15 dias)

Caso 24	04 cels/ $\mu$ L	149 cels/ $\mu$ L	0,03	01/08/1997	14/08/1997 (14 dias)
Caso 25	56 cels/ $\mu$ L	29 cels/ $\mu$ L	1,97	18/08/1997	27/08/1997 (10 dias)
Caso 26	77 cels/ $\mu$ L	617 cels/ $\mu$ L	0,12	17/07/1997	13/09/1997 (59 dias)
Caso 27	08 cels/ $\mu$ L	209 cels/ $\mu$ L	0,04	15/09/1997	16/09/1997 (01 dia)
Caso 28	162 cels/ $\mu$ L	476 cels/ $\mu$ L	0,34	09/09/1997	10/10/1997 (32 dias)
Caso 29	58 cels/ $\mu$ L	655 cels/ $\mu$ L	0,09	24/04/1997	31/10/1997 (109 dias)
Caso 30	18 cels/ $\mu$ L	168 cels/ $\mu$ L	0,1	15/07/1997	31/10/1997 (109 dias)
Caso 31	48 cels/ $\mu$ L	529 cels/ $\mu$ L	0,09	13/10/1997	04/11/1997 (23 dias)
Caso 32	375 cels/ $\mu$ L	1736 cels/ $\mu$ L	0,22	14/04/1997	10/11/1997 (179 dias)
Caso 33	56 cels/ $\mu$	526 cels/ $\mu$	0,11	20/10/1997	28/12/1997 (70 dias)
Caso 34	47 cels/ $\mu$ L	131 cels/ $\mu$ L	0,36	30/12/1997	14/01/1998 (16 dias)
Caso 35	18 cels/ $\mu$ L	116 cels/ $\mu$ L	0,16	02/03/1998	16/03/1998 (15 dias)
Caso 36	15 cels/ $\mu$ L	181 cels/ $\mu$ L	0,08	02/03/1998	02/04/1998 (32 dias)
Caso 37	72 cels/ $\mu$ L	430 cels/ $\mu$ L	0,17	22/01/1998	07/04/1998 (76 dias)
Caso 38	36 cels/ $\mu$ L	252 cels/ $\mu$ L	0,14	06/11/1998	11/11/1998 (06 dias)

Caso 39	66 cels/ $\mu$ L	269 cels/ $\mu$ L	0,25	20/01/1999	08/02/1999 (20 dias)
Caso 40	136 cels/ $\mu$ L	216 cels/ $\mu$ L	0,63	30/12/1998	03/03/1999 (64 dias)
Caso 41	10 cels/ $\mu$ L	324 cels/ $\mu$ L	0,03	01/03/1999	10/03/1999 (10 dias)
Caso 42	31 cels/ $\mu$ L	295 cels/ $\mu$ L	0,11	03/03/1999	16/03/1999 (14 dias)
Caso 43	12 cels/ $\mu$ L	184 cels/ $\mu$ L	0,07	10/03/1999	18/03/1999 (09 dias)
Caso 44	45 cels/ $\mu$ L	1835 cels/ $\mu$ L	0,02	08/03/1999	25/03/1999 (18 dias)

cels/ $\mu$ L: células por  $\mu$ L; \* CD4 normal: 700 a 3200/  $\mu$ L; \*\* CD8 normal: 300 a 1600  $\mu$ L; Razão CD4/CD8 normal: 1.

**Tabela 09.** Tipo de infiltrado inflamatório e lesões encontradas nas glândulas parótidas. A inflamação crônica foi classificada em ausente, discreta, moderada, intensa e granulomatosa(Vargas *et al.*2003).

Registro	Infiltrado Inflamatório crônico	Lesões encontradas
Caso 01	Ausente	Nenhuma
Caso 02	Granulomatoso	Sialadenite; Micobacteriose
Caso 03	Intenso	Sialadenite
Caso 04	Ausente	Nenhuma
Caso 05	Moderado	Sialadenite
Caso 06	Ausente	Nenhuma

Caso 07	Ausente	Nenhuma
Caso 08	Granulomatoso	Sialadenite; Micobacteriose
Caso 09	Granulomatoso	Sialadenite; Micobacteriose
Caso 10	Discreto	Sialadenite
Caso 11	Intenso	Sialadenite
Caso 12	Ausente	Nenhuma
Caso 13	Discreto	Sialadenite; Criptococose
Caso 14	Granulomatoso	Sialadenite; Micobacteriose
Caso 15	Discreto	Sialadenite
Caso 16	Discreto	Sialadenite
Caso 17	Ausente	Nenhuma
Caso 18	Ausente	Citomegalovirose
Caso 19	Granulomatoso	Sialadenite; Micobacteriose
Caso 20	Ausente	Citomegalovirose
Caso 21	Ausente	Nenhuma
Caso 22	Ausente	Citomegalovirose; Micobacteriose atípica, Cisto Linfoepitelial
Caso 23	Ausente	Nenhuma
Caso 24	Ausente	Criptococose

Caso 25	Ausente	Citomegalovirose
Caso 26	Discreto	Sialadenite
Caso 27	Discreto	Sialadenite
Caso 28	Intenso	Sialadenite; Micobacteriose
Caso 29	Ausente	Citomegalovirose
Caso 08	Ausente	Criptococose
Caso 30	Ausente	Citomegalovirose
Caso 31	Ausente	Nenhuma
Caso 32	Intenso	Sialadenite
Caso 33	Ausente	Nenhuma
Caso 34	Moderado	Sialadenite; Micobacteriose atípica; Histoplasmose
Caso 35	Discreto	Sialadenite

**Tabela 10.** Tipo de infiltrado inflamatório e lesões encontradas nas glândulas submandibulares. A inflamação crônica foi classificada em ausente, discreta, moderada, intensa e granulomatosa (Vargas *et al.*2003).

<b>Registro</b>	<b>Infiltrado Inflamatório crônico</b>	<b>Lesões encontradas</b>
Caso 01	Ausente	Nenhuma
Caso 02	Granulomatoso	Sialadenite; Micobacteriose
Caso 03	Granulomatoso	Sialadenite; Micobacteriose

Caso 04	Intenso	Sialadenite
Caso 05	Granulomatoso	Sialadenite; Micobacteriose
Caso 06	Ausente	Nenhuma
Caso 07	Ausente	Nenhuma
Caso 08	Ausente	Nenhuma
Caso 09	Granulomatoso	Sialadenite; Micobacteriose
Caso 10	Moderado	Sialadenite
Caso 11	Moderado	Sialadenite
Caso 12	Ausente	Nenhuma
Caso 13	Ausente	Nenhuma
Caso 14	Ausente	Nenhuma
Caso 15	Ausente	Citomegalovirose
Caso 16	Granulomatoso	Sialadenite
Caso 17	Discreto	Sialadenite; Citomegalovirose
Caso 18	Granulomatoso	Sialadenite; Micobacteriose
Caso 19	Ausente	Nenhuma
Caso 20	Ausente	Citomegalovirose
Caso 21	Ausente	Nenhuma

Caso 22	Ausente	Criptococose
Caso 23	Moderado	Sialadenite
Caso 24	Granulomatoso	Sialadenite; Micobacteriose
Caso 25	Ausente	Nenhuma
Caso 26	Ausente	Citomegalovirose
Caso 27	Ausente	Criptococose
Caso 28	Ausente	Citomegalovirose
Caso 29	Discreto	Sialadenite
Caso 30	Ausente	Citomegalovirose
Caso 31	Discreto	Sialadenite
Caso 32	Granulomatoso	Sialadenite; Micobacteriose
Caso 33	Moderado	Sialadenite
Caso 34	Ausente	Citomegalovirose
Caso 35	Ausente	Citomegalovirose
Caso 36	Discreto	Sialadenite
Caso 37	Macrofágico difuso	Sialadenite; Micobacteriose
Caso 38	Moderado	Sialadenite

---

**Tabela 11.** Tipo de infiltrado inflamatório e lesões encontradas nas glândulas sublinguais. A inflamação crônica foi classificada em ausente, discreta, moderada, intensa e granulomatosa (Vargas *et al.*2003).

<b>Registro</b>	<b>Infiltrado Inflamatório crônico</b>	<b>Lesões encontradas</b>
Caso 01	Discreto	Sialadenite
Caso 02	Ausente	Nenhuma
Caso 03	Moderado	Sialadenite
Caso 04	Granulomatoso	Sialadenite; Micobacteriose
Caso 05	Moderado	Sialadenite
Caso 06	Ausente	Nenhuma
Caso 07	Discreto	Sialadenite
Caso 08	Ausente	Nenhuma
Caso 09	Granulomatoso	Sialadenite; Micobacteriose
Caso 10	Ausente	Nenhuma
Caso 11	Discreto	Sialadenite
Caso 12	Ausente	Nenhuma
Caso 13	Granulomatoso	Sialadenite; Micobacteriose
Caso 14	Discreto	Sialadenite

Caso 15	Ausente	Nenhuma
Caso 16	Intenso	Sialadenite
Caso 17	Ausente	Nenhuma
Caso 18	Granulomatoso	Sialadenite; Micobacteriose
Caso 19	Ausente	Criptococose
Caso 20	Ausente	Citomegalovirose
Caso 21	Discreto	Sialadenite
Caso 22	Granulomatoso	Sialadenite; Micobacteriose
Caso 23	Ausente	Nenhuma
Caso 24	Ausente	Nenhuma
Caso 25	Ausente	Nenhuma
Caso 26	Discreto	Sialadenite
Caso 27	Discreto	Sialadenite

---



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**  
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**



**CERTIFICADO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Estudo da resposta do sistema imune inato em glândulas salivares maiores de pacientes autopsiados com AIDS em fase avançada", protocolo nº 155/2006, dos pesquisadores **ANDRÉIA APARECIDA DA SILVA** e **PABLO AGUSTIN VARGAS**, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 24/01/2007.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba – State University of Campinas, certify that the project "Assessment of the innate immune system in the major salivary glands of patients with advanced AIDS", register number 155/2006, of **ANDRÉIA APARECIDA DA SILVA** and **PABLO AGUSTIN VARGAS**, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 24/01/2007.

  
**Prof. Cécilia Gatti Guirado**  
Secretária  
CEP/FOP/UNICAMP

  
**Prof. Jacks Jorge Júnior**  
Coordenador  
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.  
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.