OSMAR SHIZUO OKUDA

**DETECÇÃO DO HERPES SIMPLES VÍRUS, CITOMEGALOVÍRUS,
EPSTEIN-BARR VÍRUS E BACTÉRIAS PERIODONTOPATOGÊNICAS
EM BOLSAS PERIODONTAIS DE PACIENTES COM PERIODONTITE
CRÔNICA E GENGIVITE**

São Paulo

2009

OSMAR SHIZUO OKUDA

Detecção do Herpes simples vírus, Citomegalovírus, Epstein-Barr vírus e bactérias periodontopatogênicas em bolsas periodontais de pacientes com periodontite crônica e gengivite

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

Área de Concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Assoc. Luiz A. P. A. de Lima

São Paulo

2009

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

Okuda, Osmar Shizuo

Detecção do herpes simples vírus, citomegalovírus, Epstein-Barr vírus e bactérias periodontopatogênicas em bolsas periodontais de pacientes com periodontite crônica e gengivite. / Osmar Shizuo Okuda; orientador Luiz A. P. A. de Lima. -- São Paulo, 2009.

77p. : fig., tab. ; 30 cm.

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

1. Herpes simples 2. Doenças periodontais 3. Periodontite
4. Gengivite

CDD 617.63

BLACK D65
D64

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE E COMUNICADA AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, ____/____/____

Assinatura:

E-mail:

FOLHA DE APROVAÇÃO

Okuda OS. Detecção do Herpes simples vírus, Citomegalovírus, Epstein Barr vírus e bactérias periodontopatogênicas em bolsas periodontais de pacientes com periodontite crônica e gengivite [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

São Paulo, _____ / _____ / 2009.

Banca Examinadora

1) Prof.(a) Dr.(a) _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof.(a) Dr.(a) _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof.(a) Dr.(a) _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A minha mãe **Miyoko** e ao meu pai **Tetuo** pelo amor, apoio e carinho que vocês sempre tiveram por mim e desde sempre incutiram-me os valores e princípios éticos e morais dos quais jamais me afastei.

Especialmente, a minha futura esposa **Jenny**. Eu te amo muito.

Ao meu irmão **Marcelo** e a minha irmã **Márcia**, adoro estar com vocês.

A minha sobrinha **Lívia** que trouxe muita alegria na nossa família.

A minha Tia **Toyoko**, que sempre esteve comigo.

Minha cunhada **Simone** e ao meu cunhado **Edney**.

A família **Chu: Sr. Chu Wai Man, Sra. Chu Kuk Kuk, Frank Chu e Kátia Tsai**.

Aos meus **mestres**, que em cada etapa da minha trajetória ensinaram-me através da palavra e do exemplo que a busca do conhecimento deve ser contínua.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus**

Prof. Assoc. Luiz Antônio Pugliesi Alves de Lima, meu orientador e excelente professor que ajudou a concluir esta tese, transmitindo muito conhecimento de forma exigente, crítica e criativa.

A **Dra. Ana Vitória Imbronito**, uma pessoa que desde o início me apoiou e ensinou o mundo da pesquisa.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Roberto Fraga Moreira Lotufo (*in memoriam*)**, agradeço pela sua confiança, estímulo e apoio.

Ao **Prof. Assoc. Fabio Daumas Nunes**, que se disponibilizou a me ajudar com a FAPESP, Comitê de ética em pesquisa e a disponibilização do laboratório de Patologia molecular .

Sabrina Rosa Grande e Dra Nívea Maria de Freitas que participaram deste trabalho com muita dedicação

Aos **Prof.Dr. Cláudio Mendes Pannuti e Prof. Titular Francisco Emílio Pustiglioni** que participaram no exame de qualificação e pré defesa.

Jenny Chu pela paciência, colaboração e disponibilidade em ajudar a formatar a tese.

Considero que a elaboração de uma dissertação de mestrado é um produto coletivo. Várias pessoas contribuíram para que este trabalho chegasse a bom termo. A todas elas registro minha gratidão.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Titular Francisco Emílio Pustiglioni**, pelos ensinamentos transmitidos de com muita responsabilidade e dedicação.

Ao **Prof. Dr. Koto Nakae** pelo incentivo e apoio na graduação.

Aos Professores da Disciplina de Periodontia da FOU SP, **Prof. Dr. Cesário Antonio Duarte, Prof. Dr. Cláudio Mendes Pannuti, Prof. Assoc. Giorgio de Micheli, Prof. Dr. Giuseppe Alexandre Romito, Prof. Emérito José Hildebrando Todescan, Prof. Dr. Koto Nakae, Prof. Dr. Luiz Antônio Pugliesi Alves de Lima, Prof. Dr. Marco Antônio P. Georgetti, Profa. Dra. Marina Clemente Conde, Prof. Dr. Roberto Fraga Moreira Lotufo (*in memoriam*)**, que muito me ensinaram enriquecendo sobremaneira meus conhecimentos em Periodontia.

Ao **Prof. Victor Elias Arana-Chavez** e **Prof. Titular Mario Julio Avila-Campo** pela disposição e ajuda.

Aos meus amigos da turma de mestrado que cursaram juntos: **Rodrigo A. B. dos Santos, Rodrigo Carlos. N. C. Pinto e Marcio Seto Yu Yuen.**

Aos meus amigos do curso de pós graduação pela amizade: e relacionamento harmônico e produtivo cientificamente: **Ana Karina Pinto de Andrade, André Micheletti Hespanhol, Ariana Soares Rodrigues, Caroline Gomes Paixão, Cassia Tiemi Fukuda Nakashima, Christiane Watanabe Yorioka, Daniele Salami, Ecilene Francisca Rosa, Fabio Luís Moura Lima, Fernando Hayashi, Fernando Peixoto Soares, Flavia Sukekava, Giovane H. Gomes, Hsu Shao Feng, Isabela Maria Porto Araújo Britto, Juliana Cleaver Aun, Leandro Chambrone, Luciana Ávila Maltagliati, Mariana S. Ragghianti, Priscila Corraini, Ricardo Takiy Sekiguchi, Sabrina Rosa Grande, Silvia Linard Marcelino, Valéria Gondim da Silva e Vanessa Tubero E. Alves.**

Aos meus amigos do serviço de Controle & Manutenção: **Carlos Cheque Bernardo** e **Veronica Carvalho**.

Aos colegas do laboratório de Patologia molecular (LPM) coordenado pelo prof.: **Fabio Daumas Nunes: Ana Vitória Imbronito, Camila de Oliveria Rodini, Fabio Luiz Coracin, Flavia Calo de Aquino Xavier, Katiucia Batista da Silva Paiva, Nívea Maria de Freitas Sabrina Rosa Grande, Silvia Linard Marcelino e Thais Acquafreda Antunes** pelo auxílio e paciência.

Às colegas da disciplina **Dra. Ilíria Salomão Feist, Cristiane Del Cioppo e Livia Sonoda**.

A minha amiga e ex-secretária a disciplina de Periodontia: **Gilmara Luisa Hortêncio Angel “Mara”**.pela ajuda.

Às secretárias da Disciplina de Periodontia: **Márcia Aparecida dos Santos e Marília Camargo Gomes**, pela amizade e disposição a colaborar.

Às secretárias da Disciplina de Patologia bucal **Nair Maria Pereira, Néia Barbosa e Zilda Natalina Ramos Alves** e a secretária do Departamento de Estomatologia **Vera Lúcia Cordeiro dos Santos Almeida** agradeço por sempre colaborarem comigo

Às bibliotecárias da FOU SP: **Maria Ap. Pinto, Vânia M. B. O. Funaro, Maria Cláudia Pestana e Gláuci E. D. Fidelis** pela revisão da dissertação. Aos funcionários da biblioteca da FOU SP (SDO) e da FOU SP.

À **FAPESP**, pelo auxílio à pesquisa

À **CAPES**, pela bolsa de mestrado.

À todos os pacientes que participaram desta pesquisa, pois sem eles nenhuma dessas páginas estariam completadas.

À todas as pessoas que contribuíram para a execução dessa dissertação.

Okuda OS. Detecção do Herpes simples vírus, Citomegalovírus, Epstein Barr vírus e bactérias periodontopatogênicas em bolsas periodontais de pacientes com periodontite crônica e gengivite [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

RESUMO

Recentemente, estudos têm associado a presença de vírus da família *herpesviridae* à doença periodontal, os quais poderiam estar envolvidos na ocorrência e progressão de diferentes formas da doença periodontal, através da supressão do sistema imune do periodonto, liberação de citotoxinas, mediadores pró-inflamatórios, o que poderia favorecer o crescimento subgengival de microrganismos. Neste estudo, testamos a hipótese de que a prevalência do herpes vírus na placa subgengival de pacientes com gengivite é igual a de pacientes portadores de periodontite crônica. Desse modo, o presente estudo teve como objetivo determinar a presença dos vírus Herpes simples vírus tipo 1 (HSV-1), Citomegalovírus (HCMV) e Epstein-Barr vírus tipo 1 (EBV-1), relacionando-os com a presença de bactérias periodontopatogênicas como: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella intermedia* (Pi), *Tannerella forsythia* (Tf) e *Dialister pneumosintes* (Dp) em amostras de placa subgengival, coletadas de 30 pacientes portadores de periodontite crônica (grupo PC), 30 pacientes com gengivite (grupo G) e 30 indivíduos periodontalmente saudáveis (grupo C). Foram coletadas quatro amostras de placa subgengival do sítio mais profundo de cada quadrante nos pacientes do grupo PC e nos pacientes do grupo G e C, um sítio aleatório de cada quadrante foi examinado. A detecção de espécies bacterianas e de herpes vírus na placa subgengival dos grupos foi realizada por PCR e Nested PCR,

respectivamente. A análise estatística mostrou que o HCMV foi detectado com frequência similar nos três grupos estudados e que houve uma maior prevalência do HSV-1, EBV-1 e *P. intermedia* nos pacientes com periodontite crônica e gengivite em relação ao grupo controle. Houve associação da periodontite crônica com o EBV-1 e as cinco bactérias estudadas, além da associação entre os vírus (EBV-1+ HCMV; EBV-1 + HSV-1; HSV-1 + HCMV) e entre vírus e bactérias (EBV-1+ *P.intermedia*, EBV-1 + *P. gingivalis*; HCMV + *T. forsythia*; HCMV + *A. actinomycetemcomitans*; HSV-1 + *T. forsythia*; HSV-1 + *P. gingivalis*).

Palavras-chave: periodontite crônica, herpes vírus, HSV-1, EBV-1, HCMV, periodontopatógenos, PCR.

Okuda OS. Detection of simplex herpesviruses, Citomegalovirus, Epstein - Barr virus and periodontal pathogens in periodontal pockets of chronic periodontitis and gingivitis patients [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

ABSTRACT

Recently, studies have linked the presence of the virus family *herpesviridae* and periodontal disease, which may be involved in the occurrence and progression of different forms of periodontal disease through the suppression of the immune system of the periodontium, release of cytotoxins, pro-inflammatory mediators and immunopathological events, may promote growth of subgingival microorganisms. In this study, we tested the hypothesis that the prevalence of herpes virus in subgingival plaque of patients with gingivitis is equal to patients with chronic periodontitis. Thus, this study aimed to determine the presence of the virus Herpes simplex virus type 1 (HSV-1), Cytomegalovirus (HCMV) and Epstein-Barr virus type 1 (EBV-1), relating to the presence of bacteria as periodontopathogens: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella intermedia* (Pi), *Tannerella forsythia* (Tf) and *Dialister pneumosintes* (Dp) in subgingival plaque samples collected from 30 patients with chronic periodontitis (CP group), 30 patients with gingivitis (group G) and 30 periodontally healthy subjects (group C). We collected four samples of subgingival plaque from the deepest site in each quadrant and in the PC group and patients in group C and G, a random site in each quadrant was examined. The detection of bacterial species and herpes virus in subgingival plaque of the groups were identified by PCR and nested

PCR respectively. Statistical analysis showed that HCMV was detected with a similar frequency among the three groups and significant difference in prevalence of HSV-1, EBV-1 and *P. intermedia* in patients with gingivitis in the control group. The chronic periodontitis was associated with EBV-1 and the five bacteria studied, and the association of the virus (EBV-1 + HCMV, EBV-1 + HSV-1, HSV-1 + HCMV) and between viruses and bacteria (EBV-1+ *P.intermedia*, EBV-1 + *P. gingivalis*; HCMV + *T. forsythia*; HCMV + *A. actinomycetemcomitans*, HSV-1 + *T. forsythia*; HSV-1 + *P. gingivalis*).

Keywords: chronic periodontitis, herpes virus, HSV-1, EBV-1, HCMV, periodontopathogens, PCR.

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Relação dos iniciadores, concentrações de magnésio e temperatura de anelamento, comprimento do produto e referência	46
Tabela 5.1 – Descrição dos dados clínicos do grupo com periodontite crônica (grupo PC), gengivite (grupo G) e pacientes periodontalmente saudáveis (grupo C)	47
Tabela 5.2 – Prevalência de vírus e bactérias presentes em placa subgengival do grupo PC, G e C.....	48
Tabela 5.3 – Prevalência da coinfeção herpes vírus e bactérias em placa subgengival do grupo PC, G e C.....	50
Tabela 5.4 – Frequência de associação entre vírus e bactérias de acordo com o grupo.....	51

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

µl	unidade de medida referente a 1 microlitro
µg	unidade de medida referente a 1 micrograma
AAP	“American Academy of Periodontology”/ Academia americana de Periodontia
ATCC	“American type culture collection”
BZLF1	Proteína transativadora do EBV
C+	Controle positivo
C-	controle negativo
Células Hela	célula Henrietta Lacks
dATP	desoxiadenosina trifosfato
dCTP	desoxicitidina trifosfato
dGTP	desoxiguanosina trifosfato
DNA	ácido desoxiribonucléico
dNTPs	desoxiribonucleotídeos trifosfatados
dTTP	desoxitimidina trifosfato
EBV	Epstein- Barr vírus
EBV-1	Epstein -Barr vírus tipo 1
<i>et al.</i> “etalii”	referência em latim que significa “e outros”
HCMV	Citomegalovírus
HHV-6	herpes vírus tipo 6
HHV-7	herpes vírus tipo 7
HHV-8	herpes vírus tipo 8
HSV	Herpes vírus simples
HSV-1	Herpes vírus tipo 1

HSV-2	herpes vírus tipo 2
IP	índice de placa
Kbp	pares de kilobases
KCl	cloreto de potássio
M	molar
mA	miliampere
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
ml	unidade de medida referente a 1 mililitro
mM	unidade de medida referente a 1 milimolar
NCI	nível clínico de inserção
Nested PCR	“nested polimerase chain reaction”
Ng	unidade de medida referente a 1 nanograma
Pag	periodontite agressiva
PagL	periodontite agressiva localizada
Pb	pares de base
PBS	tampão salino
PCR	reação em cadeia da polimerase
PCS	profundidade clínica de sondagem
PGE ₂	prostaglandina E ₂
pH	potencial hidrogeniônico
PIP	periodontite de incidência precoce
pM	unidade de medida referente a 1 picomolar
PKC	Proteína Quinase C
receptores Fc	Moléculas encontradas na superfície de algumas, mas não de todos os linfócitos B, linfócitos T e macrófagos que reconhecem e combinam-se com a porção Fc (cristalizável) das moléculas de imunoglobulinas.
pmoles	picomoles
Rpm	rotações por minuto

SS	sangramento à sondagem
TAE	“Tris-Acetate EDTA buffer”
TE Tris- EDTA	“Ethylenediamine Tetra acetic Acid; buffered solution” solução de Tris e EDTA
TM	temperatura de anelamento
TNF- α	“tumor necrosis factor – alpha”/ fator de necrose tumoral –alfa
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
UV	ultra violeta
V	Volts
VZV	vírus Varicela zoster
ZEBRA	Proteína transativadora do EBV
W	Watts

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
3 PROPOSIÇÃO	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
5 RESULTADOS	47
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS	61
ANEXOS.....	74

2 INTRODUÇÃO

A composição da microflora subgengival é complexa e heterogênea. A presença e a proporção de microrganismos variam conforme a gravidade da doença desde uma condição de periodonto sadio às diversas formas da doença periodontal (PAGE; BECK 1997; SOCRANSKY; HAFFAJEE 1992; UMEDA et al., 1998) nas quais a infecção microbiana tem papel proeminente no processo patogênico.

Uma forte associação foi demonstrada entre a periodontite e diversos microrganismos como o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella intermedia* (Pi), *Tannerella forsythia* (Tf), *Fusobacterium nucleatum* (Fn) e *Treponema denticola* (Td) (HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2000; SOCRANSKY et al., 1998) e *Dialister pneumosintes* (Dp) (CONTRERAS et al., 2000; SLOTS; SUGAR; KAMMA, 2002).

Até o presente momento é cientificamente aceito que, embora patógenos bacterianos específicos subgengivais sejam necessários para o desenvolvimento da periodontite, apenas a presença do biofilme dental não parece ser suficiente para explicar as características clínicas patológicas da doença (KUBAR et al., 2005; SAYGUN et al., 2002; SLOTS, KAMMA; SUGAR, 2003; YAPAR et al., 2003).

Estudos recentes sugerem que o herpes vírus pode estar envolvido na ocorrência e progressão de diferentes formas da doença periodontal (CONTRERAS; SLOTS 2000; SLOTS, 1999; SLOTS; CONTRERAS, 2000). Genomas do Citomegalovírus (HCMV) e Epstein-Barr vírus tipo 1 (EBV-1) foram detectados com frequência na periodontite do adulto grave (CONTRERAS; SLOTS, 1996; PARRA; SLOTS, 1996), periodontite juvenil localizada (MICHALOWICZ et al., 2000; TING;

CONTRERAS; SLOTS, 2000; IMBRONITO et al., 2008) e generalizada (IMBRONITO et al., 2008; SKREPCINSKI et al., 1997), síndrome Papillon-Lefèvre (VELAZCO et al., 1999), síndrome de Down (HANNOKAI et al., 2000), periodontite associada ao HIV (CONTRERAS; MARDIROSSIAN; SLOTS, 2001; GRANDE et al., 2008) e gengivite ulcerativa aguda (CONTRERAS et al., 1997). O herpes vírus foi identificado no fluído crevicular de lesões periodontais (CONTRERAS et al., 1997; KLEMENC et al., 2005; PARRA; SLOTS, 1996), biópsias (CASSAI et al., 2003; ROTOLA et al., 2008), placa subgengival (IMBRONITO et al., 2008; LING et al., 2004; SAYGUN et al., 2002), saliva (IMBRONITO et al., 2008; SAYGUN et al., 2005; TATEISHI et al., 1994; VALIMAA et al., 2002) e sangue periférico (IMBRONITO et al., 2008).

É importante salientar que o herpes vírus tem atraído o interesse devido sua habilidade de causar uma infecção latente que periodicamente se reativa, a qual apresenta similaridade com o curso da periodontite (SLOTS; KAMMA; SUGAR, 2003). A plausibilidade biológica da infecção ativa do herpes vírus seria uma supressão do sistema imune do periodonto, liberação de citotoxinas, mediadores pró-inflamatórios como citocinas e quimiocinas, podendo favorecer o crescimento subgengival de microrganismos (SLOTS; CONTRERAS, 2000).

Diversos estudos avaliaram o herpes vírus em pacientes com doença periodontal em regiões diversas como em Taiwan (LING et al., 2004), China (LI; ZHANG; ZHANG, 2004; WU et al., 2007), Japão (IDESAWA et al., 2004), Estados Unidos da América (CONTRERAS; SLOTS, 1996, 1998; TING; CONTRERAS; SLOTS, 2000), Jamaica (MICHALOWICZ et al., 2000), Turquia (KUBAR et al., 2005; SAYGUN et al., 2002), Nigéria (CONTRERAS et al., 1997), Itália (CASSAI et al., 2003; ROTOLA et al., 2008), Eslovênia (KLEMENC et al., 2005), Romênia (JOSEPH;

FLAITZ; CHEN, 2003), Grécia (KAMMA; CONTRERAS; SLOTS, 2001; KONSTANTINIDIS et al., 2005) e França (MADINIER et al., 1992).

Uma questão ainda em aberto na periodontia é a evolução da gengivite para periodontite, ou da doença da estabilidade periodontal para a atividade da doença. Diante da possível participação da imunossupressão local e sua associação a eventos destrutivos periodontais, seria interessante buscar informações sobre a relação dos herpes vírus com alguns patógenos periodontais em pacientes com periodontite crônica, gengivite e indivíduos periodontalmente saudáveis.

Algumas informações são insuficientes para explicar importantes características da doença, como destruição localizada e padronizada na maioria dos pacientes, desarranjo bilateral simétrico e exacerbação intermitente da doença em determinados dentes (SLOTS; SUGAR; KAMMA, 2002). Essa variação de manifestações clínicas da periodontite é provavelmente devido aos diferentes tipos e quantidade de agentes infecciosos associados à resposta do hospedeiro.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Nas últimas três décadas, importantes estudos foram realizados para melhor compreensão dos agentes infecciosos da doença periodontal (SLOTS; RAMS, 1992; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 1994). Antes de 1970, a placa bacteriana foi considerada o fator etiológico da doença periodontal, porém nenhum estudo avaliava a relação entre espécies bacterianas e a doença periodontal (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2000). A partir dos anos 70, foi demonstrado que existia diferença microbiana associada ao periodonto saudável em relação ao periodonto doente (SLOTS, 1979). Desde então, grandes avanços foram realizados através de estudos da microbiologia, imunologia e suas relações com a doença periodontal. Desde 1996, o HSV, o HCMV e o EBV foram considerados possíveis patógenos da doença periodontal (SLOTS, 2002).

Slots e Contreras (2000) relataram que alguns casos de doença periodontal ocorrem como um processo de causa multifatorial, envolvendo uma complexa interação entre vírus, bactérias e fatores do hospedeiro, sugerindo um modelo de patogênese da doença periodontal, associada ao herpes vírus.

A infecção por EBV e HCMV pode implicar na patogênese e progressão da doença periodontal (SABETI et al., 2003^a; SAYGUN et al., 2005; SLOTS; SUGAR; KAMMA, 2002). A presença desses vírus, associados às bactérias periodontopatogênicas foi estudada na região subgengival em diversas formas da doença periodontal (SAYGUN et al., 2008; SUNDE et al., 2008b). A correlação do HCMV e do EBV na patogênese e progressão da periodontite agressiva foi avaliada por Kamma e Slots (2003), Kubar et al. (2004) e Saygun et al. (2004a). Estudos

prévios sugerem que a periodontite ocorre com maior frequência, e com progressão mais rápida, em sítios infectados pelo EBV e HCMV em comparação aos sítios sem a presença do vírus (LING et al., 2004; SLOTS, 2004b). Enquanto a coinfeção de ambos está associada a inflamação e destruição do tecido periodontal (WU et al., 2007).

2.1 Mecanismo patogênico do herpes vírus na doença periodontal

Vários mecanismos patogênicos induzidos por vírus podem ter um papel importante na doença periodontal. Primeiramente, o herpes vírus pode causar um efeito citopático nos fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais e inflamatórias, leucócitos polimorfonucleares, linfócitos, macrófagos e células ósseas (ONGRANDI; SALLAY; KULCSAR, 1987).

Os vírus podem produzir danos no tecido periodontal, devido sua capacidade de lise, como resultado da resposta imunopatológica. Foi demonstrado que o HCMV infecta células endoteliais, fibroblastos e o epitélio das glândulas salivares (DREW, 1988). A infecção viral pode também ativar reações do sistema imune, destruindo tecidos e/ou alterando a defesa imunológica. O HCMV pode infectar linfócitos e monócitos, causando redução significativa na produção de interleucinas e na capacidade destas células proliferarem na presença de mitógenos. A expressão do EBV altera profundamente a resposta de células T e ativa células “natural killer” contra células B (RICKINSON; KIEFF, 2001). O herpes vírus pode infectar células

imunológicas (leucócitos polimorfonucleares, linfócitos e monócitos), resultando na estimulação ou inibição do sistema imune (PARRA; SLOTS, 1996).

O herpes vírus pode induzir a expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. O EBV e o HCMV podem desregular a produção de interleucina 1 β (IL-1 β) e do fator de necrose tumoral α (TNF- α) nos monócitos e macrófagos (PARRA; SLOTS, 1996; WARA-ASWAPATI; BOCH; AURON, 2003). Por sua vez, a IL-1 β e o TNF- α podem desregular a matriz de metaloproteinase, diminuir os inibidores de metaloproteinase e os mediadores de destruição óssea periodontal. Um elevado nível de citocinas pró-inflamatórias pode estar associado com o aumento do risco da destruição do tecido periodontal (PAGE et al., 1997).

Estudos realizados em animais e humanos sugerem que a infecção pelo herpes vírus é capaz de causar necrose óssea (HOOVER; GRIESEMER, 1971a, 1971b), osteopenia (JENSON; ROBERT, 1987) e fraturas do osso (KOPELMAN; MINNEFOR; HALSTED, 1972; SMITH; SPECHT, 1979). Talvez a infecção do herpes vírus e seus envoltórios intrínsecos causem hipoplasia do cemento observada em dentes de pacientes com periodontite juvenil localizada, enquanto o HCMV, adquirido na fase infantil, pode ajudar a explicar as características da lesão da periodontite juvenil localizada na dentição primária (SJÖDIN et al., 1989). Além disso, Smith Mac Donald et al. (1998) verificaram que o HCMV e o EBV-1 podem interferir na cicatrização e regeneração do periodonto, devido à liberação de citocinas no tecido.

Slots (2005) e Slots e Contreras (2000) e construíram um modelo de infecção periodontal, baseado na interação do herpes vírus, bactérias e resposta do hospedeiro (Figura 2.1). A infecção do herpes vírus em sítios periodontais pode alterar a resposta local através de mecanismos isolados, ou em combinação com

outros agentes infecciosos. Inicialmente, a infecção bacteriana no tecido gengival causa uma inflamação tecidual, apresentando macrófagos, monócitos, linfócitos T e B infiltrados no tecido gengival inflamado, abrigando o HCMV e o EBV na forma latente em tipos específicos de células (LUPI; PEREIRA, 2000). Em indivíduos imunocompetentes, a infecção primária do herpes vírus é geralmente assintomática e sua reativação pode ser clinicamente silenciosa (BRITT; ALFORD, 1996; MOCARSKI; STINSKI, 1979) e de maneira espontânea ou desencadeada por fatores como: estresse, trauma físico, tabaco, imunossupressão, inflamação, exposição aos raios ultravioletas, radioterapia e outras condições como infecção pelo HIV, gravidez e alterações hormonais. (EHRlich; COHEN; HOCHMAN, 1983). Monócitos e macrófagos infectados pelo HCMV produzem IL-1 β , TNF- α e outras citocinas. Essas citocinas podem atuar na inflamação, indução de reabsorção óssea e interferir na formação de colágeno. Outro mecanismo do herpes vírus é o favorecimento do crescimento de bactérias periodontopatogênicas. Tyler e Fields (1996) verificaram que as infecções por herpes vírus ativas apresentam um maior potencial de destruição do periodonto, quando comparadas às infecções na fase latente.

Figura 2.1 - Modelo da relação do Herpesvirus com a doença periodontal, de acordo com Slots e Contreras (2000) e Slots (2005)

2.2 Associação entre Herpes vírus e doença periodontal

A literatura apresentou poucos artigos relacionados aos herpes vírus na doença periodontal. Sabiston (1986) sugeriu uma associação entre o HCMV e a gengivite ulcerativa necrosante (GUN), embora não tenha apresentado nenhuma evidência experimental para comprovar a sua hipótese, outros autores apresentaram casos clínicos que propuseram a relação entre o herpes vírus e a GUN (JIMENEZ; BAER, 1975; SHEIHAM, 1966). Burghilea e Serb (1990, 1993) mostraram, em biópsia do tecido gengival de pacientes com periodontite juvenil, que células

inflamatórias apresentavam estruturas nucleares e citoplasmáticas semelhantes ao vírus, posteriormente descoberto por Ting, Contreras e Slots (2000). Em 1994, Contreras avaliou a presença do HSV, em amostras de saliva de 9 pacientes com periodontite avançada, 10 pacientes com periodontite moderada e 11 pacientes com periodontite leve. O HSV estava presente em 44% dos pacientes com periodontite avançada, 20% dos pacientes com periodontite moderada e em nenhum caso de pacientes com periodontite leve.

Mais recentemente, a associação entre os vírus da família do herpes simples e a doença periodontal tem sido explorada. Genomas do HCMV e do vírus EBV-1 foram freqüentemente detectados em pacientes com periodontite crônica (CONTRERAS; SLOTS, 1996), periodontite juvenil localizada (TING; CONTRERAS; SLOTS, 2000), periodontite juvenil generalizada (SKEREPCINSKI et al., 1997), periodontite associada à síndrome de Papillon-Lefèvre (VELAZCO et al., 1999) entre outras.

Em paciente com doença periodontal, o herpes simples vírus foi detectado com frequência no fluido gengival e biópsia do tecido gengival de 13 pacientes com periodontite do adulto e de 1 paciente com periodontite juvenil localizada. O HCMV foi encontrado em 64% das bolsas periodontais e em 86% dos tecidos gengivais. O EBV- 1 foi encontrado em mais de 43% das bolsas periodontais e em 79% dos tecidos gengivais (CONTRERAS; NOWAZARI; SLOTS, 2000). Ainda não se sabe o tempo de permanência do herpes vírus no tecido gengival. Os estudos prévios apenas determinaram a presença do herpes vírus na bolsa periodontal. Para delinear o local e a ocorrência do herpes vírus no tecido gengival, foi avaliada a biópsia do tecido gengival, comparando a ocorrência do herpes vírus nas amostras

do fluído crevicular de bolsas periodontais e das correspondentes biópsias do tecido gengival.

O HSV, o EBV e o HCMV podem promover a colonização de organismos patogênicos através de múltiplos mecanismos. Uma infecção do herpes vírus no tecido gengival pode prejudicar o sistema de defesa do organismo, alterando a função de leucócitos polimorfonucleares, linfócitos e macrófagos (CONTRERAS; SLOTS, 2000). *In vitro*, os vírus estudados diminuíram a fagocitose e causaram uma explosão oxidativa e morte intracelular dos neutrófilos polimorfonucleares. Uma disfunção dos neutrófilos, induzida pelo vírus poderia facilitar o crescimento e a virulência da *P. gingivalis* e outros microrganismos da microbiota subgengival. A infecção pode causar a lise ou afetar as células do epitélio oral. A ruptura da barreira de proteção epitelial do periodonto pode facilitar o acesso de bactérias periodontopatogênicas para a área mais profunda (CONTRERAS et al., 1999; TING; CONTRERAS; SLOTS, 2000). A glicoproteína viral expressa na membrana celular de células infectadas, induz a adesão celular e molecular aos receptores Fc que podem servir como um novo receptor bacteriano. O vírus pode alterar as células epiteliais, podendo aumentar a aderência de periodontopatógenos e a sua invasão epitelial (CONTRERAS et al., 1999b).

Parra e Slots (1996) analisaram amostras do fluído crevicular de 30 pacientes com periodontite avançada e 26 pacientes com gengivite. Foi verificado que 78% dos pacientes com periodontite avançada eram positivos para pelo menos um dos cinco vírus estudados, sendo 60% para o HCMV, 30% para o EBV, 20% para o HSV-1, 17% para HPV e 7% para o HIV. A associação entre 2 vírus foi encontrada em 40% dos pacientes e apenas 1 paciente apresentou os 5 dos vírus descritos. No mesmo ano, Contreras e Slots, (1996) realizaram um estudo semelhante em 27

pacientes adultos com periodontite para avaliar a frequência do HCMV, EBV-1, EBV-2, HSV e HIV em amostras subgengivais, através da Nested PCR. Os resultados mostraram que 89% dos pacientes tinham ao menos um dos cinco vírus nas bolsas mais profundas. Para os sítios com profundidade rasa, 56% dos pacientes foram positivos a um dos vírus. O HCMV foi encontrado em 14 pacientes, sendo o vírus mais frequente em bolsas profundas.

Contreras e Slots (1998) realizaram em 6 indivíduos com periodontite do adulto e 3 adolescentes com periodontite juvenil, o método de RT PCR (reação da transcriptase reversa, seguida da reação da polimerase em cadeia) para determinar a transcrição do RNA mensageiro (mRNA) do HCMV subgengival. Observou-se o ácido desoxiribonucleico (DNA) do HCMV subgengival em 89% dos casos com periodontite e em apenas 22% dos casos de gengivite. O HCMV foi detectado em bolsas profundas de 2 pacientes com periodontite do adulto e de 2 pacientes com periodontite juvenil.

Contreras et al. (1999a) examinaram em 140 pacientes com gengivite, periodontite leve, moderada e grave a relação entre a presença dos herpes vírus (EBV-1, EBV-2 e HCMV), a doença periodontal e o potencial periodontopatogênico das bactérias (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *B. forsythus*, *P. nigrescens* e *T. denticola*) no ambiente subgengival. Os resultados mostraram que 53% dos pacientes com periodontite grave tinham ao menos um dos quatro vírus avaliados e 23% apresentaram coinfeção viral. O HCMV esteve presente em 33% das amostras, o EBV-1 em 20%, EBV-2 em 10% e o HSV em 7%. Dos pacientes com periodontite moderada, 2 tinham o HCMV, 13% o EBV-1 e 8% o HSV.

Baseados no fato de que o *A. actinomycetemcomitans* é considerado um patógeno para periodontite juvenil localizada, Ting, Contreras e Slots (2000)

avaliaram a presença do herpes vírus e a associação da atividade do HCMV com elevados níveis subgengivais de *A. actinomycetemcomitans* na periodontite juvenil localizada. Onze pacientes sistemicamente saudáveis com periodontite juvenil localizada foram avaliados. Em cada paciente, as amostras subgengivais foram coletadas de 3 bolsas periodontais nas regiões de primeiro molar e incisivo, três sítios com gengivite e três sítios saudáveis na região de caninos. Dos 11 casos de periodontite juvenil localizada, 8 apresentavam HCMV, 7 EBV-1, 1 EBV-2, 6 HSV e 8 coinfeção viral. Dos sítios com coinfeção viral, 2 tinham HCMV, EBV-1 1 HSV e 2 coinfeção viral. A diferença da ocorrência do HCMV e da coinfeção viral entre sítios profundos e rasos foram estatisticamente significantes. A ativação do HCMV foi detectada em bolsas profundas dos 5 pacientes positivos aos herpes vírus com periodontite juvenil localizada. A ativação do HCMV parece estar relacionada com a ausência da crista alveolar e da lâmina dura. O *A. actinomycetemcomitans* tende a ser mais prevalente em amostras com infecção ativa ou latente do HCMV.

Contreras e Slots (2001) realizaram a PCR em 26 pacientes HSV positivos para detectar a presença do HSV-1 e HSV-2 em amostras de bolsa periodontal. Todos os pacientes foram positivos ao HSV-1 e nenhum ao HSV-2. Os autores comentaram que o HSV-2 tem habilidades limitadas, ou impróprias para infectar tecidos periodontais.

Saygun et al. (2002) examinaram a ocorrência do HCMV, EBV-1 e HSV em pacientes com periodontite crônica e sua relação com os vírus e os parâmetros clínicos. Amostras de placa de 30 pacientes com periodontite crônica e de 21 indivíduos saudáveis foram coletadas com pontas de papel e os seguintes parâmetros clínicos foram mensurados: índice de placa, índice gengival, PCS e NCI. O HCMV foi detectado em 44,3% dos pacientes com periodontite crônica e 14,3%

dos indivíduos saudáveis, o EBV-1 em 16,7% dos casos de periodontite crônica e 14,3% dos indivíduos saudáveis. O menos frequente foi o HSV em 6,7% dos casos de periodontite crônica e em nenhum dos indivíduos saudáveis. O HCMV e EBV-1 detectados ou não nos pacientes com periodontite crônica mostraram diferenças estatisticamente significantes nos casos de PCS e NCI. Diferenças no índice de placa e índice gengival foram estatisticamente significantes para os casos de HSV positivos e negativos.

Ling et al. (2004) avaliaram a relação entre o herpes vírus e a gravidade da periodontite. Foram selecionados 20 indivíduos e coletadas seis amostras de placa subgengival, examinadas através da Nested PCR. A prevalência do HCMV foi de 51,7%, HSV de 30,8%, seguido de 4,2% do EBV-1. A prevalência do HSV ou HCMV foi significativamente maior no grupo com baixo índice de placa (<1). No entanto, a prevalência do HSV foi maior no grupo que apresentou alto índice gengival (>2), sangramento à sondagem (SS), PCS ≥ 4 mm, nível clínico de inserção (NCI) ≥ 4 mm. Já a prevalência de EBV-1 foi maior no grupo com PCS ≥ 4 mm. A coinfeção do HSV e HCMV foi associada com sítios que apresentavam alto índice gengival (≥ 2) ou sangramento à sondagem. A coinfeção foi associada com PCS ≥ 4 mm ou perda de NCI ≥ 4 mm.

Diante da escassez de informação da presença de vírus nos abscessos periodontais, Saygun et al. (2004b) avaliaram 18 adultos com abscesso periodontal. Amostras subgengivais foram coletados com curetas estéreis de sítios afetados e não afetados no início do tratamento e 4 meses após o procedimento cirúrgico ou o tratamento com doxiciclina. O HCMV foi detectado em 66,7% dos casos de abscesso periodontal e em 5,6% dos sítios saudáveis. EBV-1 ocorreu em 72,2% dos sítios com abscesso e não foi encontrado em sítios saudáveis. A coinfeção foi

identificada em 55,6% dos casos de abscesso. Após o tratamento, o HCMV e o EBV-1 não foram detectados nos sítios estudados.

Saygun et al. (2005) realizaram a técnica de PCR real time, comparando a presença do HCMV e do EBV em sítios periodontais e na saliva, avaliando o potencial do tratamento periodontal em reduzir o nível de ambos os vírus. Vinte pacientes sistemicamente saudáveis foram examinados antes do tratamento. Após 3 meses do tratamento periodontal, que incluiu orientação de higiene bucal, raspagem e aplanamento radicular e cirurgias, sete pacientes foram reavaliados. Amostras foram coletadas da bolsa periodontal com profundidade de 6 a 10 mm, do dente adjacente a esta bolsa periodontal e da saliva sem estímulo. No exame inicial, 20 pacientes com periodontite apresentaram-se positivos a ambos os vírus, tanto na bolsa periodontal como na saliva. O tratamento periodontal reduziu bolsas de 4,6 para 1,4 mm, índice de placa 2.1 para 0.9 e o índice gengival de 2.1 para 0.4. Após o tratamento, a quantidade de DNA do HCMV reduziu-se em 37.5% nos sítios periodontais e em 64.6% na saliva. A contagem de DNA do EBV também reduziu em 5.7% nos sítios periodontais e em 12.9% na saliva.

Bilichodmath et al. (2009) investigaram a ocorrência do herpes vírus (HSV-1, HSV-2, EBV-1 e HCMV) em placa subgengival de 19 pacientes com periodontite crônica e 14 pacientes com periodontite agressiva, através da técnica multiplex PCR. Nas amostras de pacientes com periodontite crônica, o HSV-1 foi encontrado em 100%, HSV-2 em 15,7%, EBV em 78,9% e HCMV em 26,3%. Os pacientes com periodontite agressiva apresentaram 57,14% de HSV-1, 28,57% de EBV, 7,14% de HCMV e o HSV-2 não foi detectado em nenhum dos casos.

Apesar de ainda não existirem estudos populacionais avaliando a ocorrência subgengival do HSV, EBV e HCMV em pacientes com periodontite, estudos foram

realizados em diferentes regiões geográficas. Na China, Li et al. (2004) detectaram o EBV em 58% dos sítios com doença periodontal ativa, em 23% dos sítios saudáveis e em 19% dos sítios com gengivite. O estudo realizado por Ling, Zhang e Zhang (2004), avaliaram 20 participantes com idade entre 20 e 64 anos, atendidos na cidade de Taipei (Taiwan). Foram coletadas amostras de placa subgengival e analisada a presença do HSV, HCMV e EBV-1. Após a análise de 120 sítios, a prevalência de HCMV foi de 51,7%, do HSV com 30,8% e do EBV-1 com 4,2%. A coinfeção do HSV com o HCMV foi significativamente associada aos sítios com alto índice gengival (≥ 2) ou com sangramento à sondagem. A coinfeção foi associada a PCS ≥ 4 mm e perda de NCI ≥ 4 mm.

Contreras et al. (1997), investigaram a presença do herpes vírus em lesões de gengivite ulcerativa necrosante (GUN), através da coleta de fluído crevicular de crianças de 3 a 14 anos de idade na Nigéria. Das 22 crianças com GUN, 15 apresentaram infecção viral e 8 coinfeção viral, 13 pacientes foram positivos ao HCMV, 5 para o EBV-1 e 1 para o HSV. Vinte por cento do grupo não afetado pela GUN mostraram a presença do vírus e nenhum revelou coinfeção.

Idesawa et al. (2004), no Japão detectaram o EBV em 49% dos casos de periodontite crônica e em 15% dos pacientes periodontalmente saudáveis.

Kubar et al. (2005) na Turquia, detectaram o HCMV e o EBV em 46% das bolsas periodontais. A coinfeção entre HCMV e EBV-1 ocorreu em 23% dos casos com periodontite crônica.

Nos Estados Unidos, Corey (2000) verificou que o anticorpo do HSV-1 foi encontrado entre 50% à 60% da classe média e em quase 90% da população com baixa condição sócio-econômica. Contreras, Nowzari e Slots (2000) encontraram o HCMV em 64% e o EBV-1 em 43% dos sítios com periodontite.

No Brasil, a presença do herpes vírus em bolsas periodontais foi avaliado por Tanikawa et al. (2001), realizando um estudo para avaliar uma possível associação do herpes vírus com o *A. actinomycetemcomitans* e a periodontite crônica. Amostras de placa subgengival foram coletadas de 6 pacientes acometidos pela doença. O herpesvírus foi detectado em 33,3% das amostras. O *A. actinomycetemcomitans* e o herpesvírus foram detectados nos mesmos pacientes, sugerindo a possibilidade da interação de vírus e bactéria no processo infeccioso da doença periodontal destes pacientes.

Outro estudo foi realizado por Rodrigues (2003) avaliando a detecção de *Porphyromonas gingivalis* e vírus do herpes simplex em saliva e placa subgengival. As amostras foram coletadas de 76 pacientes com periodontite e 40 indivíduos periodontalmente saudáveis. No grupo estudo, *P. gingivalis* foi identificada apenas na placa subgengival (15,8%). Herpesvírus foram detectados na placa (40,8%) e na saliva (78,7%), sendo o HSV em 56,7% e 36,7% dos casos, respectivamente. No grupo controle, as amostras de placa foram detectados *P. gingivalis* (5%) e herpesvírus (67,5%), enquanto o HSV foi detectado apenas na saliva.

Suguihara (2004) estudou a detecção de *P. intermedia*, *P. nigrescens* e herpes vírus (HSV-1 e HHV-7) em saliva e placa subgengival de pacientes com doença periodontal. Amostras foram coletadas de 76 pacientes com periodontite e 40 indivíduos saudáveis. No grupo estudo, amostras de *P. intermedia* e *P. nigrescens* foram identificadas na placa subgengival (19,7%). Herpesvírus foram detectados na placa (40,8%) e na saliva (78,7%), sendo o HSV em 56,7% e 36,5% dos casos, respectivamente. O HHV-7 foi detectado em 19,3% das amostras de placa subgengival e 46% nas de saliva. No grupo controle, as bactérias foram detectadas em 10% das amostras examinadas e os herpesvírus em 67,5%, sendo que o HSV

foi identificado somente na saliva. O HHV-7 foi identificado na placa subgengival (33,3%) e na saliva (67,5%). A presença concomitante de *P. intermedia*, *P. nigrescens* e herpesvírus na placa de pacientes com a doença periodontal foi registrada em 3,9% dos casos. A correlação das bactérias com vírus da família *herpesviridae* foi estatisticamente significativa, assim como a relação das mesmas com o HSV-1 e o HHV-7 na saliva.

Em 2005, Imanishi investigou o HCMV e o EBV na doença periodontal humana, comparando a frequência desses vírus nos sítios com gengivite e com periodontite. Foram colhidas amostras do fluido crevicular de 30 pacientes com periodontite agressiva. Cada paciente foi submetido a 2 coletas de sítios com gengivite e outras duas de sítios com periodontite. Duas amostras (1,67%) foram positivas para o HCMV e 53 delas (44,2%), positivas para o EBV-1. Somente um sítio exibiu infecção mista pelos dois vírus testados. Houve diferença na ocorrência de EBV-1 entre os sítios com gengivite e os sítios com periodontite, tendo ocorrido maior número de casos EBV-1 positivos nos sítios com periodontite. Não foi constatada diferença estatística significativa para o HCMV entre os dois grupos. O EBV-1 foi o vírus mais prevalente, ocorrendo em 77% dos indivíduos pesquisados. A presença de EBV-1 com maior frequência nos sítios com periodontite sugere uma associação positiva desse vírus com as lesões de periodontite agressiva.

2.3 Bactérias periodontopatogênicas associadas aos herpes vírus na doença periodontal

A composição da placa dental na cavidade bucal é complexa e diversificada. Estima-se através de métodos de cultura e moleculares que aproximadamente 700 espécies bacterianas estejam presentes na cavidade bucal, entre as quais, mais de 400 espécies bacterianas foram identificadas na bolsa periodontal (PASTER et al., 2006).

Estudos mostraram relação de microrganismos da microbiota subgingival, particularmente os gram negativos anaeróbios como fatores etiológicos da periodontite crônica e agressiva (DZINK et al., 1985; SLOTS, 1986). *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *B. forsythus* são considerados os principais patógenos na destruição da doença periodontal. Outros microrganismos também podem contribuir para o desenvolvimento da doença periodontal (TANNER et al., 1987).

Em pesquisas médicas, a cooperação do vírus humanos e bactérias específicas em doenças polimicrobianas é um assunto de grande interesse. Como exemplo, o HCMV parece ser um fator de risco para o desenvolvimento de infecções bacterianas em pacientes transplantados do fígado, aumentando a adesividade de patógenos nas células gastrointestinais (HOLBERG- PETERSE et al., 1994).

Seguindo o mesmo princípio, a infecção periodontal causada pelo herpes vírus pode favorecer o aumento do nível e a patogenicidade de bactérias periodontopatogênicas. A infecção do herpes vírus diminui a contagem de células de defesa no periodonto, o que facilitaria o crescimento de bactérias patogênicas periodontais.

Na periodontite crônica, a presença do HCMV e EBV subgengival foi relacionada com a alta ocorrência de patógenos periodontais como *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *D. pneumosintes*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *C. rectus*, *T. denticola* e outros patógenos periodontais (CONTRERAS et al., 1999^a; SAYGUN et al., 2004^a; SLOTS; KAMMA; SUGAR, 2003; SLOTS; SUGAR; KAMMA, 2002). A periodontite agressiva localizada com infecção ativa do HCMV pode elevar o nível de *A. Actinomycescomitans* (TING; CONTRERAS; SLOTS, 2000). O herpes vírus pode perturbar células inflamatórias envolvidas na defesa do periodonto, dessa maneira predispondo uma super infecção bacteriana ou afetando o potencial de adesão das bactérias periodontais, possivelmente de forma específica (TEUGHELIS et al., 2002). Os mesmos autores, mostraram que o *A. actinomycescomitans* tem maior habilidade de aderir e invadir células epiteliais (HeLa) infectadas pelo HCMV do que as não infectadas.

Kamma, Contreras e Slots (2001) examinaram a ocorrência do herpes vírus humano e bactérias periodontopatogênicas em pacientes com periodontite de incidência precoce, com progressão da doença em pelo menos 2 sítios durante a fase de manutenção periodontal. De cada um dos 16 indivíduos foram coletadas amostras de placa subgengival de 2 sítios com progressão e 2 sítios com estabilidade da doença periodontal. O HCMV foi detectado em 59,4% dos sítios ativos e 12,5% dos sítios estáveis. O EBV-1 em 43,8% dos sítios ativos e 12,5% dos sítios estáveis. O HSV foi encontrado em 34,5% dos sítios ativos e 9,4% dos sítios estáveis. A coinfeção com um dos 3 vírus foi observada em 43,8% dos sítios ativos e 3,1% dos sítios estáveis. A *P. gingivalis* foi encontrada em 71,9% dos sítios ativos e 37,5% dos sítios estáveis. A *D. pneumosintes* foi detectada em 62,5% dos sítios ativos e 18,8% dos sítios estáveis. A coinfeção com *P. gingivalis* e *D. pneumosintes*

ocorreu em 50% dos sítios ativos e em nenhum dos sítios estáveis, enquanto a coinfeção com 3 ou 4 bactérias ocorreu em 40,6% dos sítios ativos e nenhum dos sítios estáveis. Todos os sítios com progressão da periodontite apresentaram coinfeção com herpesvírus.

O estudo realizado por Slots, Sugar e Kamma (2002) avaliaram a relação entre HCMV, EBV-1, HSV e bactérias anaeróbias, incluindo a *D. pneumosintes* na doença periodontal. Foram selecionados 16 adultos gregos, com idade média de 33,1 anos, com periodontite agressiva. As amostras foram coletadas de 2 sítios com a doença e de 2 sítios com estabilidade no NCI. O estudo mostrou uma significativa associação do HCMV com a *D. pneumosintes* ($P=0.003$) e com bolsas periodontais ($P=0.04$), sugerindo relação com a atividade da doença.

Através da PCR convencional uma associação da presença subgengival do EBV e elevado nível de periodontopatógenos, assim como o *P. gingivalis*, foram estudados em adultos com periodontite (CONTRERAS et al., 1999^a). Os resultados do trabalho de Sugano et al. (2004) confirmam os achados, com uma elevada proporção de *P. Gingivalis* em pacientes com a presença do EBV, utilizando a técnica de PCR em tempo real. A disrupção da latência do EBV é mediada pela proteína transativadora do EBV (ZEBRA), um produto da proteína do gene imediato do EBV (BZLF1) (KENNEY S. et al., 1989). *In vitro*, (PMA), um potente ativador da proteína quinase C (PKC), induz a reativação do EBV (DAVIES et al., 1991), e sabe-se que *P. Gingivalis* tem um potencial de ativação da sinalização do PKC (SHAPIRA et al., 1997). Esses resultados sugerem que a interação é bi-direcional, com reativação do EBV, suprimindo a defesa do hospedeiro e permitindo o crescimento *P. gingivalis*, assim como a *P. gingivalis* tem potencial de induzir a reativação do EBV.

O EBV pode contribuir para o crescimento do número de periodontopatógenos, através de diversos mecanismos. A presença do EBV na infecção gengival pode prejudicar a defesa local do hospedeiro através da interleucina 10 medida pela imunossupressão, linfócitos B policlonais e ativação ou indução de anticorpos e antineutrófilos, assim permitindo o aumento de *P. gingivalis* em pacientes com EBV (SLOTS; CONTRERAS, 2000).

Em 2003, Slots, Kamma e Sugar examinaram o papel do HCMV, EBV-1, HSV e *P. Gingivalis* na patologia da periodontite agressiva. Os resultados mostraram que o HCMV e o HSV foram predisponentes para presença do *P. gingivalis*, porém não encontrou relação significativa entre EBV-1 e *P. gingivalis*, mas o vírus foi predisponente para atividade da doença.

O HCMV no periodonto pode aumentar o crescimento subgengival da *D. pneumosintes*, já a *D. pneumosintes* pode ativar o HCMV latente na infecção periodontal ou haver uma interação bidirecional entre o HCMV e a *D. pneumosintes*. Essas três possibilidades parecem ocorrer na doença periodontal (SLOTS; SUGAR; KAMMA, 2002). A interação do HCMV e a *D. pneumosintes* pode conduzir o aumento da produção de citocinas destrutivas, elevando a patogenia da microbiota residente e diretamente na citotoxicidade das células do tecido periodontal (SLOTS; CONTRERAS, 2000).

A infecção do HCMV aumenta a adesividade de patógenos em células gastrointestinais (PETERSEN et al., 1994) e um mecanismo similar poderia facilitar a aderência do *A. actinomycetecomytans* na cavidade oral. Um estudo realizado por Teughels et al. (2007) examinaram a possibilidade da infecção do HCMV em células epiteliais, confirmando a hipótese do aumento da aderência do *A. actinomycetecomytans in vitro*. O HCMV associado ao *A. actinomycetecomytans*

pode ser um fator importante na patogenia da periodontite (SLOTS, 2005). Nos estudos de Ting, Contreras e Slots (2000) verificaram que o *A. actinomycetecomytans* tende a ser mais prevalente em amostras de sítios ativo em comparação aos sítios latente do HCMV ($p= 0.036$).

4 PROPOSIÇÃO

A proposição deste trabalho foi determinar a presença e a associação dos vírus HSV-1, HCMV, EBV-1 a bactérias periodontopatogênicas *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* e *D. pneumosintes* nas amostras de bolsas periodontais de pacientes brasileiros com periodontite crônica não tratada, gengivite e pacientes periodontalmente saudáveis.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Seleção dos indivíduos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo sob o parecer nº 24/05, protocolo (Anexo A) e todos os pacientes que participaram do estudo foram informados sobre a sua natureza e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B).

Foi realizada uma investigação sobre a história médica e dental dos pacientes do grupo com periodontite crônica, gengivite e controle. Todos os indivíduos deveriam apresentar boa saúde geral. Foram excluídos do trabalho os indivíduos com história de diabetes, pacientes grávidas ou em período de lactação, os pacientes que utilizaram antiinflamatórios de forma crônica, pacientes com história de hepatite e infecção por HIV, fumantes pesados (>15 cigarros/dia), de acordo com Guntch et al. (2006), pacientes com aparelhos ortodônticos e pacientes submetidos à antibioticoterapia e tratamento periodontal nos últimos 6 meses.

Foram selecionados 90 pacientes na clínica de pós-graduação da FOUSP, com no mínimo 20 dentes. Trinta pacientes com periodontite crônica (grupo PC), apresentando PCS ≥ 4 mm e perda de NCI ≥ 4 mm em 4 ou mais sítios. O grupo G, composto por trinta pacientes com gengivite sem perda de NCI ≥ 4 mm e com sangramento a sondagem em pelo menos 15 dentes. Para o grupo controle (grupo C) foram selecionados 30 adultos periodontalmente saudáveis sem evidência clínica de perda de inserção em nenhum dos dentes (ARMITAGE, 2004).

Os pacientes foram avaliados clinicamente por um único examinador e os seguintes parâmetros registrados: índice de placa de O'Leary, índice de sangramento à sondagem (SS), PCS e NCI em 6 sítios/dente (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual/palatino, lingual/palatino e disto-lingual/palatino) com o auxílio de uma sonda periodontal¹. Foram tomadas 14 radiografias periapicais para os pacientes com periodontite crônica. Os pacientes foram tratados periodontalmente e mantidos num programa de Controle e Manutenção periodontal.

5.2 Coleta dos espécimes

Foram coletadas 4 amostras de placa sub-gengival de cada indivíduo. Nos pacientes portadores de periodontite crônica, foram coletadas amostras do sítio mais profundo de cada quadrante. Nos pacientes com gengivite foram coletadas de um sítio com sangramento a sondagem de cada quadrante e nos indivíduos saudáveis, um sítio aleatório de cada quadrante foi selecionado para coleta. Antes da coleta subgengival, a placa supragengival foi removida com curetas. Após isolamento relativo da área com rolete de algodão, uma ponta de papel absorvente estéril² foi introduzida em cada sítio e mantida por 20 segundos (SLOTS; REYNOLDS, 1982). As pontas foram então transferidas para um tubo de microcentrífuga³ e mantidas a -70°C.

¹ PCPUNC 15, HuFriedy, Chicago, IL, USA

² Tanari, SP, Brasil

³ AxygenScientific Inc., CA, USA

5.3 Extração do DNA

Aos cones de papel foram adicionados 0,5ml de água destilada e homogeneizados em um vortex⁴. O DNA viral foi recuperado após a ligação deste à sílica em alta concentração de tiocianato de guanidina (GuSCN), segundo o método descrito por Parra e Slots (1996).

O volume 0,25ml de espécimes sub-gengivais foi diluído em 0,25ml de água bidestilada e homogeneizado em vortex⁴. Deste, 0,4ml da amostra foram misturados com 0,8ml de tampão de lise GuSCN (120g de tiocianato de guanidina, 100 ml de 0,1mM de Tris-HCl⁵ pH 6,4, 22 ml de 0,2M EDTA, pH 8,0, 2,6g de Triton X-100) e 0,05ml de partículas de sílica⁶. Após homogeneização em vortex⁴, a amostra foi mantida em temperatura ambiente por 10 minutos. O complexo DNA/sílica foi recuperado após centrifugação⁷ a 12.000 x g durante 1 minuto, lavado duas vezes em tampão de lise (GnSCN, Tris-HCl), duas vezes em etanol 70% e uma vez em acetona. A amostra foi seca a 56°C por 10 minutos e o pellet foi ressuscitado em 100µl de tampão TE e o DNA foi separado da sílica após incubação a 56°C por 10 minutos e centrifugação⁷ a 12000 x g por 2 minutos. O sobrenadante foi armazenado em freezer -70°C.

⁴ Vortex, Scientific Industries, NY, USA

⁵ Tris (hidroximetil) aminometanol. Invitroge Corporatin, Ca, USA

⁶ Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA

⁷ Centrífuga IEC – Micromax

4.4 Quantificação

Realizou-se a quantificação em espectrofotômetro⁸ com leitura em 260/280nm, utilizando uma alíquota de solução de cada amostra de DNA. A absorvência de 260nm equivale à quantidade de DNA e a de 280nm, a de proteínas. A pureza dos estratos de DNA foi obtida pela razão de absorvência 260/280nm. O valor considerado ideal foi de 1,8 a 2,0.

4.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A técnica de Nested-PCR foi usada para o DNA viral do HSV-1, EBV-1 e HCMV. Para detecção bacteriana do *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* e *Dialister pneumosintes* foi empregado à técnica de PCR estágio único.

A técnica da PCR foi padronizada para cada par de iniciador, em separado, sendo otimizada, entre outras condições, diferentes concentrações de Cloreto de Magnésio⁹ (MgCl₂), de DNA e dos iniciadores senso e anti- senso foram as descritas por Ashimoto et al. (1996), Darlington et al. (1991), Espy e Smith (1995), Garcia et al. (1998) e Tsurumi, Maeno e Nishiyama (1987) (Tabela – 4.1).

⁸ Espectrofotômetro Beckman DU® 640, USA

⁹ Cloreto de Magnésio, Invitrogen Corporation, Brazil

Todas as reações foram feitas em microtubos¹⁰ de 0,5 ml para PCR adicionando: tampão de PCR 1X¹¹ (Tris-HCl 200mM, pH 8,4; KCl 500mM) (Invitrogen), dNTP 0,05mM (2'-deoxinucleotídeos 5'- triosfato, dATP, dTTP, dCTP, dGTP)¹², MgCl₂ , iniciadores senso e anti-senso ¹³, 1U Taq platinum DNA polimerase¹⁴ para amplificação do DNA viral ou 1U Taq DNA polimerase¹⁵ para amplificação do DNA bacteriano, 1 a 10 µl do DNA da amostra extraída e água estéril para um volume final de 25µl. Todas as reações de amplificação foram realizadas em um termociclador¹⁶. Para as reações de “Nested PCR” foi utilizado na segunda amplificação 1 µl do produto da primeira.

As condições de ciclagem da PCR foram otimizada para os diferentes iniciadores e como base foi inicialmente utilizado: desnaturação inicial a 94°C/3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C/1 minuto, associação a 52°C/50 segundos, extensão a 72°C/1 minuto e extensão final a 72°C/7 minutos.

Para reações de Nested-PCR, em um novo microtubo de 0,5ml, uma segunda etapa de amplificação foi realizada, empregando-se 1 a 4µl do primeiro produto da PCR, 40-100mmol do correspondente primer interno e 10X tampão, MgCl₂, dNTP 0,05mM (2'-deoxinucleotídeos 5'- triosfato, dATP, dTTP, dCTP, dGTP) e Taq platinum DNA polimerase. Para o segundo PCR, foram 35 ciclos de denaturação a 94°C durante 1 minuto, uma etapa de anelamento a 55°C durante 1 minuto e uma etapa de extensão final a 72°C durante 1 minuto e extensão final a 72°C/7 minutos.

¹⁰ Microtubo Axygen Scientific Inc., CA, USA

¹¹ Tampão de PCR 1X, Invitrogen Corporation, Brazil

¹² dNTP (2'- deoxinucleotídeos 5'- trifosfato, dATP, dTTP, dCTP, dGTP), Invitrogen Corporation, USA

¹³ Iniciadores de senso e antisense, Invitrogen Corporation, Germany

¹⁴ Taq DNA polymerase platinum, Invitrogen Corporation, CA, USA

¹⁵ Taq DNA polimerase, Invitrogen Corporation, Brazil

¹⁶ Termociclador, Mastercycler, Eppendorf, Germany

Em todas as reações de PCR foi utilizado um controle positivo e negativo. O controle negativo era constituído por todos os reagentes presentes na reação, porém isento de DNA. O controle positivo para EBV-1 foi originário de células B de linfoma e o HSV-1 e HCMV foram obtidos do laboratório de virologia da USP. Para as bactérias, os controles positivos foram DNA de cultura pura de bactérias para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 29522), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Prevotella intermedia* (ATCC 25611), *Tanarella forsythia* (ATCC 43037) e *Dialister pneumosintes* (ATCC 33048). Para Nested PCR, o controle negativo continha todos os reagentes presentes na reação isento de DNA, além do controle negativo da primeira PCR.

4.6 Análise dos resultados

Os produtos da amplificação por PCR (10 µl) foram previamente avaliados em gel de agarose¹⁷ a 2%, contendo brometo de etídio¹⁸ à 0,2µg/ml. Utilizou-se uma cuba horizontal de eletroforese (70 V por 45 minutos), contendo tampão de corrida TAE¹⁹ 1X, pH 8,1. Para a visualização e documentação do gel de amplificação do DNA foi utilizado um transluminador sob luz ultravioleta²⁰. O resultado das reações foi documentado utilizando-se o sistema AlphaDigiDoc[®] RT²¹ e uma câmera fotográfica Polaroid DS4²² com filme Polaroid modelo 667²³ e uma câmera digital Olympus²⁴.

¹⁷ Agarose, Invitrogen Corporation, CA, USA

¹⁸ Brometo de etídio, Invitrogen Corporation, CA, USA

¹⁹ TAE Tris-Acetate EDTA buffer, Invitrogen Corporation, CA, USA

²⁰ Transluminador de luz ultravioleta, Fotodyne, Inc Hartland, WI, USA

²¹ AlphaDigiDoc[®] RT (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA)

²² Polaroid DS4, FISHER biotech, USA

²³ Polaroid tipo 667. Polaroid Inc., MA, USA

²⁴ câmera digital Olympus, Japan

A todos os géis foi inserido um marcador de pares de base Low DNA mass Ladder²⁵, o qual representa uma mistura equimolar de fragmentos de DNA de 2000pb a 100 pb.

4.7 Análise estatística

O teste de χ^2 (Qui-quadrado) foi usado para comparar os grupos em relação ao sexo, raça e fumo. Para distribuição de idade, número de dentes, diferenças na PCS e perda de NCI foi usado o teste de ANOVA.e Post Hoc Para comparação das diferenças e associações na frequência dos vírus e bactérias nos grupos periodontite crônica, gengivite e controle foram usados o teste χ^2 (Qui-quadrado) e em algumas análises, empregou-se o teste exato de Fischer. O nível de significância estatística foi de 95%.

²⁵ Low DNA Mass Ladder, Invitrogen Corporation, Germany

Tabela 4.1 – Relação dos iniciadores, concentrações de magnésio e temperatura de anelamento, comprimento do produto e referência

Microorganismo	Iniciador	Seqüência de nucleotídeos 5'-3'	TM (°C) e MgCl ₂ (mM)	Produto (pb)	Referência
Herpes simplex vírus 1 (x03101)	Externo	TACATCGGCGTCATCTACGGGG GGGCCAGGCGCTTGTGGTGTA	57 (1.0)	331	Tsurumi et al. (1987)
	Interno	GCGTTTATCAACCGCACCTCC CAGTTCGGCGGTGAGGACAAA	56 (1.0)	222	
Citomegalovírus (x17403)	Interno	GAGGACAACGAAATCCTGTTGGGCA TCGACGGTGGAGATACTGCTGAGG	56 (1.5)	150	Darlington et al. (1991)
	Externo	ACCACCGCACTGAGGAATGTCAG TCAATCATGCGTTTGAAGAGGTA	50 (1.0)	100	
Epstein- Bar vírus 1 (S71027)	Interno	AGGATGCCTGGACACAAGA TGGTGCTGCTGGTGGCAA	60 (1.5)	602	Espy e Smith(1995)
	Externo	TCTTGATAGGGATCCGCTAGGATA ACGGTCGTTCTGGACTATTCGGATC	55 (1.5)	116	
<i>Agregatibacter actinomycetemcomitans</i> (M75039)		GTAGGTATTGCGAAACAATTTG CCTGAAATTAAGCTGGTAATC	55	262	Ashimoto et al.(1996)
		TGTAGATGACTGATGGTGAAAACC ACGTCATCCCCACCTTCTC	60	197	
<i>Porphyromonas gingivalis</i> (AF414813.1)		ATGAAACAAAGGTTTTCCGGTAAG CCCACGTCTCTGTGGGCTGCGA	55	575	Garcia et al. (1998)
<i>Prevotella intermedia</i> (A:Y689226.1)					
<i>Dialister pneumosintes</i>		TTC TAA GCA TCG CAT GGT GC GAT TTC GCT TCT CTT TGT TG		1105	Doan et al. (2000)

7 RESULTADOS

Neste estudo foram analisadas amostras de placa subgengival de 90 pacientes, distribuídos igualmente em três grupos. A descrição dos dados clínicos e a comparação entre os grupos avaliados são apresentadas na tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Descrição dos dados clínicos do grupo com periodontite crônica (grupo PC), gengivite (grupo G) e pacientes periodontalmente saudáveis (grupo C)

	Grupo PC	Grupo G	Grupo C	Valor de P
Idade	42,7 ± 6,7	25,4 ± 5,9	28,1 ± 5,8	P<0,005*
Número de dentes	24,6 ± 4,6	27,4 ± 2,3	28,3 ± 2,2	P<0,005*
Número de dentes com perda de NCI ≥ 4mm	19,2 ± 8,6	0	0	P<0,005*
PCS (média em mm)	3,4 ± 0,9	2,1 ± 0,1	2,0 ± 0,2	P<0,005*
Perda de nível clínico de inserção (média em mm)	4,4 ± 2,1	2,3 ± 0,2	2,1 ± 0,2	P=0,08*
% mulheres	53,3%	66,7%	60,0%	P=0,75†
% fumantes	13,3%	6,7%	6,7%	P=0,10†

*teste ANOVA e Post Hoc

† teste χ^2

A idade média entre os grupos G (25.4 ± 5.9 anos) e C (28.1 ± 5.8 anos) foram similares, já o grupo PC (42.7 ± 6.7 anos) apresentou uma média significativamente superior aos dois grupos (p <0,005), acometendo adultos acima de 30 anos de idade. Os grupos foram equivalentes em relação ao gênero e hábito de fumar. A porcentagem de homens foi de 46,7% (grupo PC); 33,3% (grupo G) e 40,0% (grupo C) e de mulheres 53,3% (grupo PC), 66,7% (grupo G) e 60% (grupo C). Os três grupos apresentaram uma pequena porcentagem de pacientes fumantes, semelhantes para o grupo G e C (6,7%) e uma porcentagem maior para o grupo PC (13,3%).

Ao avaliar o número de dentes e de dentes afetados pela doença periodontal (NCI $\geq$ 4mm), verificou-se que o grupo C e G apresentaram 28,3 e 27,4 dentes respectivamente e não tinham nenhum sítio com NCI $\geq$ 3mm. O grupo PC apresentou em média 24,6 dentes, sendo 19,2 dentes com NCI $\geq$ 4mm. Em relação a perda de NCI, o grupo PC teve uma média de perda de 4,4 mm, número superior ao grupo G (2,3mm) e grupo C (2,1mm).

A detecção de espécies bacterianas e de herpes vírus na placa subgengival do grupo PC, G e C foi realizada por PCR e Nested PCR respectivamente e a frequência descrita na tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Prevalência de vírus e bactérias presentes em placa subgengival do grupo PC, G e C

	Grupo PC (%)	Grupo G (%)	Grupo C (%)	P
HSV-1	12 (40.0)	16 (53.3)*	6 (20.0)	P <0,005
HCMV	15 (50.0)	12 (40.0)	17 (56.7)	P =0,60
EBV-1	14 (46.7)*	6 (20.0)*	0 (0.0)	P <0,005
<i>A.actinomycescomitans</i>	7 (23.3)*	6 (20.0)*	1 (3.3)	P <0,005
<i>P.gingivalis</i>	22 (73.3)*	14 (46.7)	14 (46.7)	P =0,03
<i>P.intermedia</i>	26 (86.7)*	23 (76.7)*	13 (43.3)	P <0,005
<i>T. forsythia</i>	10 (33.3)*	4 (13.3)	0 (0.0)	P <0,005
<i>D. pneumosintes</i>	11 (36,6)*	5 (16,6)	2 (6,6)	P <0,005

* teste χ^2 P< 0.005 comparado ao grupo controle

A prevalência do HSV-1 foi maior para o grupo G (53,3%) em relação aos grupos PC (40%) e C (20%) (p<0,005). A detecção do HCMV não mostrou diferenças significantes entre os grupos estudados PC (50%), G (40%) e C (56,7%) p= 0.60. A presença do EBV-1 foi superior no grupo PC (46,7%) e G (20%) em comparação ao grupo C, no qual não foi detectado (0%) (p<0,005).

A detecção do *A. actinomycescomitans* foi estatisticamente mais freqüente (p<0,005) no grupo PC (23,3%) e grupo G (20,0%) do que no grupo C (3,3%).

P. gingivalis foi mais prevalente no grupo PC (73,3%) em comparação ao grupo G e C que tiveram a mesma frequência (46,7%) ($p=0,03$). Pacientes do grupo PC (86,7%) e G (76,7%) foram estatisticamente similares, mas apresentaram uma maior frequência da *P. intermedia* em relação ao grupo controle (43,3%) ($p<0,005$). A *T. forsythia* foi mais prevalente no grupo PC (33,3%) que no grupo G (13,3%) e C (0,0%) ($p<0,005$). A *D. pneumosintes* foi mais frequente no grupo PC (36,6%), resultado estatisticamente significativo em comparação ao grupo C (6,6%).

A prevalência da coinfeção do herpes vírus e bactérias (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* e *D. pneumosintes*) em placa subgengival do grupo PC, G e C pode ser observada na tabela 5.3. A maior frequência da coinfeção viral ocorreu com 2 vírus em 13 pacientes do grupo PC e 9 pacientes no grupo G. No grupo C, identificou-se mais frequentemente apenas 1 dos vírus estudados (17 pacientes). Quanto a presença de coinfeção bacteriana, observamos que o grupo PC apresentou um maior índice de coinfeção, variando entre 2 a 4 bactérias. No grupo G a coinfeção esteve presente com maior frequência com 2 bactérias, apesar de a maior parte dos pacientes (20) ter apresentado apenas uma das bactérias estudadas.

Tabela 5.3 – A prevalência da coinfeção do herpes vírus e bacteriana em placa subgengival do grupo PC, G e C

	número de Coinfeção viral				número de Coinfeção bacteriana					
	0	1	2	3	0	1	2	3	4	5
PC	6	9	13	2	2	4	8	9	6	1
G	5	16	9	0	3	20	5	2	0	0
C	10	17	3	0	12	11	6	1	0	0

A frequência da associação microbiana entre vírus e bactéria é apresentada na tabela 5.4. A associação do EBV-1+ HCMV, HCMV + *T. forsythia* foi maior para o grupo PC (6) ($p= 0.003$) e (7) ($p<0.001$), respectivamente, em relação ao grupo G e

C. Já a associação do EBV-1 + HSV-1 (5) ($p=0.01$), HSV-1 + HCMV (8) ($p=0.001$), EBV-1 + *P. intermedia* (13) ($p<0.001$), (EBV-1 + *P. gingivalis* (9) ($p=0.006$), EBV-1 + *D. pneumosintes* (5) ($p=0.019$), HCMV + *A. actinomycetemcomitans* (4) ($p=0.01$), HSV-1 + *P. intermedia* (11) ($p<0.001$) foi maior para o grupo PC em comparação ao grupo C. Por outro lado, a associação entre vírus e bactérias foi superior no grupo G em relação ao grupo C para HSV-1 + *A. actinomycetemcomitans* (5) ($p<0.001$). Quando avaliamos a associação entre HSV-1 + *T. forsythia*, observamos que foi maior para os grupos PC e G (5) e (4) respectivamente, em relação ao grupo C ($p<0,001$).

Tabela 5.4 - Frequência de associação entre vírus e bactéria de acordo com o grupo

	Grupo PC	Grupo G	Grupo C	P
EBV-1+ HCMV	6*†	1	0	p = 0,003
EBV-1+ HSV-1	5*	2	0	p = 0,01*
HSV-1+ HCMV	8*	6	3	p = 0,001*
EBV-1+ <i>T.forsythia</i>	3	1	0	p = 0,07
EBV-1+ <i>A.actinomytemcomitans</i>	4	1	0	p = 0,1
EBV-1+ <i>P.intermedia</i>	13*	6	0	p<0,001*
EBV-1+ <i>P.gingivalis</i>	9*	3	0	p = 0,006*
EBV-1 + <i>D. pneumosintes</i>	5*	1	0	p=0,019
HCMV+ <i>T.forsythia</i>	7*†	1	0	p <0,001*
HCMV+ <i>A.actinomytemcomitans</i>	4*	3	0	p = 0,01*
HCMV+ <i>P.intermedia</i>	14	10	6	p = 0,06
HCMV+ <i>P.gingivalis</i>	13	6	7	p = 0,12
HCMV + <i>D. pneumosintes</i>	4	1	1	p=0,16
HSV-1+ <i>T.forsythia</i>	5*	4*	0	p<0,001*
HSV-1+ <i>A.actinomytemcomitans</i>	2	5*	0	p<0,001*
HSV-1+ <i>P.intermedia</i>	11*	9	3	p <0,001*
HSV-1+ <i>P.gingivalis</i>	10	6	4	p<0,001*
HSV-1 + <i>D. pneumosintes</i>	4	2	1	p=0,16

* Teste χ^2 (p <0.05 comparado com o grupo C)

†Teste χ^2 (p <0.05 grupo PC comparado ao grupo G)

6 DISCUSSÃO

O resultado deste estudo mostrou frequência estatisticamente maior do EBV-1 nas amostras de placa subgengival no grupo PC (46.7%) em comparação ao grupo C (0%). Chalabi et al. (2008) encontraram o EBV-1 em 73,8% dos pacientes com periodontite crônica, e em apenas um paciente do grupo controle (2,5%). Saygun et al. (2002) também obtiveram maior frequência do EBV-1 no grupo com periodontite crônica (16,7%) em comparação as amostras de indivíduos periodontalmente saudáveis (14,3%), porém sem diferença significativa. Por outro lado, o trabalho de Tantivanich et al. (2004) realizado na Tailândia, não encontraram o EBV-1 em nenhum dos grupos estudados, tanto no grupo periodontite como no grupo de pacientes periodontalmente saudáveis. O fato do EBV-1 não ter sido encontrado na placa subgengival do grupo controle sugere que este vírus pode estar associado à presença e progressão da doença periodontal.

Neste estudo, a presença do HSV-1 na placa subgengival foi maior no grupo G (53.3%) do que em pacientes do grupo PC (40%) e C (20%) ($p < 0,005$). Este resultado foi maior do que observado por outros estudos (CONTRERAS et al., 1999a; KAMMA; SLOTS, 2003). Saygun et al. (2002) detectaram uma pequena porcentagem de HSV, porém sem diferença estatística entre os grupos de pacientes com periodontite crônica (6,7%) e em pacientes saudáveis (0%). O resultado de um estudo realizado por Nishiyama et al., (2008) em pacientes da Clinica de periodontia da FOUSP, mostrou resultado semelhante ao nosso para o HSV-1 (46.4%) dos pacientes com periodontite crônica, mas para indivíduos periodontalmente saudáveis, o HSV não foi detectado (0%). Maior frequência do HSV-1 também foi

observado por Bilichodmath et al. (2009), que encontraram o HSV-1 em 100% dos casos de pacientes com periodontite crônica e que o HCMV e o EBV-1 estão mais relacionados com a etiologia da periodontite crônica que o HSV-1. Dessa maneira, nossos resultados sugerem que este vírus pode ser mais freqüente na população brasileira que nas demais populações.

Nossos resultados mostraram que a detecção do HCMV foi similar entre os grupos PC (50%), G (40%) e C (56.7%). Wu et al. (2007) encontraram uma elevada frequência do HCMV, 79% dos pacientes com periodontite crônica, 65% dos pacientes com gengivite e 78,5% dos indivíduos periodontalmente saudáveis, no entanto, estes dados não corroboram com os resultados de outros estudos como de Contreras et al. (2000), onde o HCMV foi detectado através da técnica de PCR em 60% dos pacientes com periodontite crônica e 18,1% dos indivíduos periodontalmente saudáveis e de Saygun et al. (2002) que detectaram a presença do HCMV em 43,3% dos pacientes com periodontite crônica e 14,3% dos pacientes periodontalmente saudáveis. Os autores relatam que a maior frequência do HCMV se explica devido o aumento da profundidade de clínica de sondagem e nível clínico de inserção em pacientes com periodontite crônica em comparação aos indivíduos saudáveis.

A elevada frequência da detecção do herpes vírus em amostras subgengivais de sítios com periodontite pode ser atribuída ao aumento de células inflamatórias presentes no tecido conjuntivo e adjacentes as bolsas periodontais (KUBAR et al., 2005). As células infectadas podem estar apenas transportando o DNA do vírus latente (BOTERO et al., 2008). A outra variação da prevalência do herpes vírus (HSV-1, HCMV e EBV-1) em diferentes estudos pode estar relacionada a idade e características sociais e geográficas (SMITH; ROBINSON, 2002).

O trabalho de Parra e Slots (1996) mostrou que o HCMV foi detectado com maior frequência nos indivíduos com mais de 45 anos de idade, em relação aos de idade inferior. Essa relação foi reportada por Contreras e Slots (1998) de maneira que existe uma maior frequência do herpes vírus em pacientes com periodontite e com idade mais avançada. Isto pode estar relacionado com o fenômeno da reativação local. A reativação do herpes vírus em idosos ocorre como uma consequência da idade e imunossupressão (KENNES, 1993). A relação do herpes vírus com a idade no periodonto pode explicar em parte o aumento da gravidade da periodontite em pacientes ou com idade mais avançada (LOCKER; SLADE; MURRAY, 1998). No entanto, o estudo de Ling et al. (2004) não ocorreu predileção por idade.

Nossos resultados mostraram associação maior e significativa para o grupo PC entre: EBV-1+ HCMV, HCMV + *T. forsythia* em comparação aos grupos G e C; EBV-1 + HSV-1, HSV-1 + HCMV, EBV-1 + *P. gingivalis*, EBV-1 + *D. pneumosintes*, HCMV + *A. actinomycetemcomitans*, HSV-1 + *P. intermedia* em relação ao grupo C. Slots et al. (2006) observaram que os pacientes com coinfeção pelo HCMV e EBV-1 exibiram progressão mais rápida da periodontite do que pacientes com monoinfeção (SLOTS; KAMMA; SUGAR, 2003; SLOTS; SUGAR; KAMMA, 2002). A atividade do HCMV pode reativar a infecção latente do EBV-1 e a coinfeção pode aumentar a virulência da infecção pelo herpes vírus. O estudo de Chalabi et al. (2008) indicaram que a coinfeção entre o HCMV + EBV ocorreu em aproximadamente 50% dos participantes da pesquisa com periodontite. Foi observada maior associação entre os vírus EBV-1+ HCMV; EBV-1 + HSV-1 e HSV-1 + HCMV no grupo PC em comparação ao grupo C. Já no trabalho de Slots, Kamma e Sugar (2003), o HCMV não foi associado com o EBV-1. Esta combinação

(HCMV + EBV-1) foi considerada capaz aumentar a gravidade de outras patologias como infecções periapicais (SABETI; SIMON; SLOTS, 2003) e úlceras bucais (SYRJÄNEN et al., 1999). Ling et al. (2004) detectaram a coinfeção entre o HSV e o HCMV, e sugeriram sua associação com o aumento da profundidade de bolsa, perda de NCI e uma elevada frequência do sangramento a sondagem.

A coinfeção vírus-bactéria foi descrita em diversos artigos, mas o mecanismo patológico não foi totalmente esclarecido (BROGDEN; GUTHMILLER, 2002). A infecção viral é um pré-requisito para uma infecção bacteriana ou seu agravamento, especialmente em doenças respiratórias, otite média ou gastroenterotite. Embora tenha sido descrita a coinfeção do herpes vírus e bactérias periodontopatogênicas, o mecanismo de interação, sugere apenas uma hipótese (SLOTS, 2005). Considerada etapa importante da infecção, a aderência é um requisito para o estabelecimento da população bacteriana na superfície da mucosa (REED; WILLIAMS, 1978), e o aumento da susceptibilidade para aderência bacteriana, pode favorecer o crescimento de patógenos. Os vírus são importantes no processo de pré condição para infecção bacteriana nas células (SELINGER; REED; MCLAREN, 1981). Estudos prévios sugerem que a coinfeção do herpes vírus e bactérias podem desempenhar um papel importante, especialmente na patogênese e na gravidade da destruição da doença periodontal (CONTRERAS et al., 1999a; MICHALOWICZ et al., 2000). De acordo com Slots, Kamma e Sugar (2003) o EBV-1 não apresentou associação com a *P. gingivalis*. Entretanto, nossos resultados mostraram que, dentre as bactérias avaliadas, somente a *P. gingivalis* e a *D. pneumosintes* apresentaram uma associação positiva com o EBV-1. Uma justificativa para esse resultado pode estar relacionada as variações geográficas no

mundo e em grupos sócio econômicos diferentes (DE JONG et al., 1998; GLASER et al., 1997).

No grupo PC, o HCMV teve uma maior frequência de associação com a *T. forsythia* ($p<0.001$) em relação aos grupos G e C e a *A. actinomycetemcomitans* ($p=0.01$) em comparação ao grupo C. Slots, Kamma e Sugar (2003) encontraram uma associação do HCMV e a *P. gingivalis* e esse resultado foi evidenciado por um “odds ratio” de 51.4 para essa associação na periodontite juvenil, porém o “odds ratio” individual foi de apenas 4.6 e 7.8 por Michalowics et al. (2000). Os dois estudos anteriores relacionam o HCMV e a *P. gingivalis* com a periodontite juvenil e um outro estudo de Contreras et al. (1999) relacionou com a periodontite com gravidade grave, porém sem especificar seu diagnóstico periodontal.

O HSV-1 mostrou uma relação de coinfeção com a *T. forsythia* ($p<0.001$) tanto para o grupo PC como para o grupo G. Outra coinfeção foi com a *P. intermedia*, mas este apenas para o grupo PC ($p<0.001$). No estudo de Slots, Kamma e Sugar (2003) o HSV estava relacionado com a *P. gingivalis*, um resultado diferente do nosso trabalho e de Contreras et al. (1999a).

Foi observado durante a coleta das amostras em bolsas periodontais, o sangramento à sondagem, o qual poderia ser um fator de interferência na detecção do DNA dos patógenos, porém Avilla-Campos e Velasquez-Melenquez (2002) afirmaram que a presença da hemoglobina ou outros componentes presentes subgengival não são significativamente capazes de inibir a amplificação do DNA. Porém, Slots e Contreras (2000) consideraram importante a questão do sangramento de sítios com doença periodontal. A presença do vírus ocorre com a mesma frequência em sítios com ou sem sangramento gengival, portanto o sangramento não é um pré-requisito para presença do herpes vírus, mas a

coinfecção do herpes vírus e as bactérias periodontopatogênicas podem contribuir com o aumento do sangramento gengival, devido o aumento de citocinas e o efeito citopático direto. Outra observação foi descrita por Chen e Slots (1999), o qual relata que a presença de bactérias mortas nas amostras pode aumentar a chance de detecção, através do método de PCR, mas é improvável que as células mortas restantes no biofilme possam permanecer por um longo período, por serem degradadas e dispostas a outras bactérias.

A melhor maneira de aumentar a probabilidade de detecção do vírus em pacientes com doença periodontal ainda não foi avaliada. Saygun et al. (2005) avaliou apenas 1 sítio. Em outro trabalho, Saygun et al. (2004a) avaliaram 2 sítios. Kubar et al. (2004) e Parra e Slots (1996) avaliaram 3 sítios e Contreras et al. (1999a) avaliaram 4 sítios. Neste estudo, as amostras foram coletadas dos sítios mais profundo de cada quadrante para o grupo PC, um sítio ativo, com sangramento à sondagem de cada quadrante do grupo G e um sítio de cada quadrante foi escolhido aleatoriamente para o grupo C.

Embora alguns estudos etabeleceram o envolvimento do herpes vírus na doença periodontal, os resultados foram derivados de pequenos grupos de pacientes, impedindo uma definição conclusiva da importância do herpes vírus na doença periodontal como estudos de Contreras e Slots (1998), Ling et al. (2004), Slots, Kamma e Sugar (2003), Slots, Sugar e Kamma (2002) e Ting, Contreras e Slots (2000) que coletaram amostras de 20 pacientes aleatoriamente.

Slots (1996) avaliou um total de 27 pacientes, e Bilichodmath et al. (2009) que coletaram amostras respectivamente de 19 e 14 pacientes com periodontite crônica e agressiva, número inferior de participantes e de amostras em comparação ao nosso estudo. Apenas o estudo de Contreras et al. (1999a) examinaram uma

quantidade superior de pacientes, com 140 indivíduos, porém não apresentaram um grupo controle de indivíduos periodontalmente saudáveis, da mesma forma, Kubar et al. (2005), Parra e Slots (1996), Saygun et al. (2005) e Sugano et al. (2004), não tinham um grupo controle, exceção para a pesquisa de Saygun et al. (2002) incluíram em seu estudo 30 pacientes com doença periodontal e 21 indivíduos periodontalmente saudáveis, Moghim et al. (2007) avaliaram 61 pacientes com periodontite crônica e 40 indivíduos periodontalmente saudáveis.

Uma variedade de métodos foi empregada para detecção desses microrganismos, dentre eles, a técnica de cultura, sondas de DNA, métodos imunológicos e a reação de cadeia da polimerase (ASHIMOTO et al., 1996). O método de cultivo utilizado para identificação de microrganismos como os periodontopatógenos, muitas vezes falham para organismos altamente exigente em termos atmosféricos e nutricionais, além daqueles que não são cultiváveis (PASTER et al., 2001). A análise histopatológica da infecção do HCMV, a qual mostra a identificação de células citomegálicas é considerado menos sensível que o isolamento do vírus ou técnicas de diagnóstico molecular (MONTE et al., 1996; LANDINI; LAZZAROTTO; ERTL, 1993). Citomegalia é geralmente observada apenas em tecidos com alta concentração do vírus (BRITT; ALFORD, 1996; MYERSON et al., 1984). Talvez a baixa sensibilidade da técnica para detecção do HCMV, seja a razão do porque os estudos não podiam relatar a presença do HCMV no periodonto. Portanto, como a técnica da PCR oferece uma alta sensibilidade, detecção específica e reprodutibilidade para bactérias e vírus nas amostras biológicas, o genoma dos vírus em humanos pode ser detectado no fluido crevicular de lesões periodontais (PARRA; SLOTS, 1996). Dessa maneira, a técnica tem facilitado os estudos de tipagem e subtipagem de microrganismos periodontais e a detecção do

herpes vírus em sítios periodontais têm sido realizados com o uso da técnica de PCR e Nested PCR.

Considerando a elevada frequência da detecção do vírus nos sítios periodontais, a etiologia em relação ao vírus é difícil de ser estabelecida. Dessa maneira, o conhecimento da relação entre herpes vírus e bactérias periodontopatogênicas pode ajudar ao desenvolvimento de tratamentos preventivos, procedimentos clínicos e medicamentosos controlando o vírus e o crescimento bacteriano na doença periodontal.

7 CONCLUSÕES

O HCMV foi detectado com uma frequência similar nos três grupos estudados.

O grupo PC e G apresentaram uma presença maior do HSV-1 e EBV-1 nos pacientes com a doença periodontal em relação ao grupo controle.

As cinco bactérias estudadas foram mais prevalentes no grupo PC em relação ao grupo C.

Houve associação na periodontite crônica entre os vírus (EBV-1+ HCMV; EBV-1 + HSV-1; HSV-1 + HCMV) e entre vírus e bactérias (EBV-1+ *P.intermedia* EBV-1 + *P. gingivalis*; HCMV + *T. forsythia*; HCMV + *A. actinomycetemcomitans*; HSV-1 + *T. forsythia*; HSV-1 + *P. gingivalis*).

REFERÊNCIAS¹

Ahmed R, Morrison LA, Knipe DM. Persistence of viruses. In: Field BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Field's Virology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. p. 219-50.

Armitage GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontology* 2000 2004;34:9-21.

Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* 1996;11:266- 73.

Avila-Campos MJ, Velasquez-Melendez G. Prevalence of putative periodontopathogens from periodontal patients and healthy subjects in Sao Paulo, SP, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2002 Jan-Feb;44(1):1-5.

Bilichodmath S, Mangalekar SB, Sharma DC, Prabhakar AK, Reddy SB, Kalburgi NB, et al. Herpesviruses in chronic and aggressive periodontitis patients in an Indian population. *J Oral Sci* 2009 Mar;51(1):79-86.

Botero JE, Vidal C, Contreras A, Parra B. Comparison of nested polymerase chain reaction (PCR), realtime PCR and viral culture for detection of cytomegalovirus in subgingival samples. *Oral Microbiol Immunol* 2008;23:239-44.

Britt WJ, Alford CA. Cytomegalovirus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley DM, editors. *Field's Virology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Press;1996. p. 2493-524.

Brogden KA, Guthmiller JM. Polymicrobial diseases involving viruses and bacteria. In: Brogden KA, Guthmiller JM, editors. *Polymicrobial diseases*. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2002. p. 201-334.

Burghelea B, Serb H. Nuclear bodies and virus-like particles in gingival tissue of periodontopathic patients. *Arch Roum Path Exp Microbiol* 1990;49:89-92.

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE

Burghelea B, Serb H. Ultrastructural evidence of a papova-type viral morphogenesis phenomenon in infiltrating cells from juvenile periodontal lesions. A case report. Arch Roum Path Exp Microbiol 1993;64:474-84.

Cassai E, Galvan M, Trombelli L, Rotola A. HHV- 6, HHV7, HHV-8 in gingival biopses from chronic adult periodontitis patients A case control study J Clin Periodontol 2003;30:184-91.

Chalabi M, Moghim S, Mogharehabed A, Najafi F, Rezaie F. EBV and CMV in chronic periodontitis: a prevalence study. Arch Virol 2008;153(10):1917-9. Epub 2008 Sep 14.

Chen C, Slots J. Microbiological tests for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. Periodontol 2000 1999 Jun;20:53-64.

Contreras A. Herpes simplex virus in saliva from advanced adult periodontitis cases: a viral culturing study. [Thesis], Universidad del Valle, Cali, Colombia; 1994.

Contreras A, Doan N, Chen C, Rusitanonta T, Flynn J, Slots J. Importance of *Dialister pneumosintes* in human periodontitis. Oral Microbiol Immunol 2000;15:269–72.

Contreras A, Falkler WA Jr, Enwonwu CO, Idigbe EO, Savage KO, Afolabi MB, et al. Humans herpesviridae in acute necrotizing ulcerative gingivitis in children in Nigeria. Oral Microbiol Immunol 1997;12:259-65.

Contreras A, Mardirossian A, Slots J. Herpesviruses in HIV – periodontitis. J Clin Periodontol 2001; 28:96-102.

Contreras A, Nowzari H, Slots J. Herpesviruses in periodontal pocket and gingival tissue specimens. Oral Microbiol Immunol 2000;15:15-8.

Contreras A, Slots J. Active cytomegalovirus infection in human periodontitis. Oral Microbiol Immunol 1998;13:225-30.

Contreras A, Slots J. Herpesviruses in human periodontal disease. J Periodont Res 2000;35:3-16.

Contreras A, Slots J. Mammalian viruses in human periodontitis. Oral Microbiol Immunol 1996;11:381-6.

Contreras A, Slots J. Typing of herpes simplex virus from human periodontium. *Oral Microbiol Immunol* 2001;16:63-4.

Contreras A, Umeda M, Chen C, Bakker I, Morrison JL, Slots J. Relationship between Herpesviruses and Adult Periodontitis and Periodontopathic Bacteria. *J Periodontol* 1999a;70(5):478 -84.

Contreras A, Zadeh HH, Nowzari H, Slots J. Herpesvirus infection of inflammatory cells in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1999b;14:206–12.

Corey L. Herpes simplex virus. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Mandell Douglas Bennett's principle and practice of infectious diseases*, 5th ed. Philadelphia: Churchill Livinstone; 2000. p. 1564-80.

Darlington J, Super M, Patel K, Grundy JE, Griffiths PD, Emery VC. Use of the polymerase chain reaction to analyse sequence variation within a major neutralizing epitope of glycoprotein B (gp58) in clinical isolates of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 1991;72:1985-9.

Davies AH, Grand RJ, Evans FJ, Rickinson AB. Induction of Epstein-Barr virus lytic cycle by tumor-promoting and non-tumor-promoting phorbol esters requires active protein kinase C. *J Virol* 1991 Dec;65(12):6838-44.

de Jong MD, Galasso GJ, Gazzard B et al. Summary of the II International Symposium on Cytomegalovirus. *Antiviral Res* 1998;39:141–62.

Doan N, Contreras A, Flynn J, Slots J, Chen C. Molecular identification of *Dialister pneumosintes* in subgingival plaque of humans. *J Clin Microbiol*. 2000 Aug;38(8):3043-7.

Drew WL. Diagnosis of cytomegalovirus infection. *Rev Infect Dis* 1988;10(Suppl 3): S468–S76.

Dzink JL, Tanner AC, Haffajee AD, Socransky SS. Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions. *J Clin Periodontol* 1985 Sep;12(8):648-59.

Ehrlich J, Cohen GH, Hochman N. Specific herpes simplex virus antigen in human gingiva. *J Periodontol* 1983;54(6):357-60.

Espy MJ, Smith TF. Comparison of SHARP signal system and Southern blot hybridization analysis for detection of cytomegalovirus in clinical specimens by PCR. *J Clin Microbiol* 1995;33:3028-30.

Garcia L, Tercero JC, Legido B, Ramos JA, Alemany J, Sanz M. Rapid detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* and *Porphyromona gingivalis* by multiplex PCR. *J Periodont Res* 1998;33:59-64.

Glaser SL, Lin RJ, Stewart SL, Ambinder RF, Jarrett RF, Brousset P, et al. Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease: epidemiologic characteristics in international data. *Int J Cancer* 1997 Feb 7;70(4):375-82.

Grande SR, Imbronito AV, Okuda OS, Lotufo RF, Magalhães MH, Nunes FD. Herpes viruses in periodontal compromised sites: comparison between HIV-positive and -negative patients. *J Clin Periodontol* 2008 Oct;35(10):838-45. Epub 2008 Aug 24.

Guntsch A, Erler M, Preshaw PM, Sigusch BW, Klinger G, Glockmann E. Effect of smoking on crevicular polymorphonuclear neutrophil function in periodontally healthy subjects *J Periodont Res* 2006;41:184–8.

Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000 1994;5:78-111.

Hanookai D, Nowzari H, Contreras A, Morrison JL, Slots J. Herpesviruses and periodontopathic bacteria in Trisomy 21 periodontitis. *J Periodontol* 2000 Mar;71(3):376-84.

Holberg-Petersen M, Bukholm G, Rollag H, Degre M. Infection with human cytomegalovirus enhances bacterial adhesiveness and invasiveness in permissive and semipermissive cells. *APMIS* 1994;102:703-10.

Hoover EA, Griesemer RA. Bone lesions produced by feline herpesvirus. *Lab Invest* 1971a;25:457-64.

Hoover EA, Griesemer RA. Pathogenicity of feline viral rhinotracheitis virus and effect on germfree cats, growing bone, and the gravid uterus. *J Am Vet Med Assoc* 1971b;158:929.

Idesawa M, Sugano N, Ikeda K, Oshikawa M, Takane M, Seki K, et al. Detection of Epstein-Barr virus in saliva by real-time PCR. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:230–2.

Imanishi, SAW. A investigação do Citomegalovírus e do Epstein Barr vírus na doença periodontal humana. [Dissertação de mestrado]. Faculdade de Odontologia da UFMG; 2005.

Imbronito AV, Grande SR, Freitas NM, Okuda O, Lotufo RF, Nunes FD. Detection of Epstein-Barr virus and human cytomegalovirus in blood and oral samples: comparison of three sampling methods. J Oral Sci 2008 Mar;50(1):25-31.

Jenson HB, Robert MF. Congenital cytomegalovirus infection with osteolytic lesions: use of DNA hybridization in diagnosis. Clin Pediatr (Phila)1987 Sep;26(9):448-52.

Jimenez M, Baer PN. Necrotizing ulcerative gingivitis in children: a 9 year clinical study. J Periodontol 1975; 46:715-20.

Joseph S, Flaitz C, Chen J-W. Latent Epstein–Barr viral infection in gingival tissues of HIV-positive and HIV-negative orphans in Romania. J Dent Res 2003:IADR abstract no. 1742.

Kamma JJ, Contreras A, Slots J. Herpesviruses and periodontopathic bacteria in early-onset periodontitis. J Clin Periodontol 2001;28:879-85.

Kamma JJ, Slots J. Herpesviral-bacterial interactions in aggressive periodontitis. J Clin Periodontol 2003;30:420-6.

Klemenc P, Skaleric U, Artnik B, Nogrsek P, Marin J. Prevalence of some herpesviruses in gingival crevicular fluid. J Clin Virol. 2005 Oct;34(2):147-52.

Kennes B. Immunodeficiency in aging. Acta Chir Belg 1993 May-Jun;93(3):115-8.

Kenney S, Kamine J, Holley-Guthrie E, Lin JC, Mar EC, Pagano J. The Epstein-Barr virus (EBV) BZLF1 immediate-early gene product differentially affects latent versus productive EBV promoters. J Virol. 1989 Sep;63(9):3878-83.

Knaup B, Schunemann S, Wolff MH. Subclinical reactivation of herpes simplex virus type1 in the oral cavity. Oral Microbiol Immunol 2000 Oct;15(5):281-3.

Konstantinidis A, Sakellari D, Papa A, Antoniadis A. Real-time polymerase chain reaction quantification of Epstein–Barr virus in chronic periodontitis patients. J Periodont Res 2005 Aug;40(4):294-8.

Kopelman AE, Minnefor AB, Halsted CC. Osteomalacia and spontaneous fractures in twins with congenital cytomegalic inclusion disease. *J Pediatr* 1972;81:101-5.

Kubar A, Saygun I, Özdemir A, Yapar M, Slots J. Real-time polymerase chain reaction quantification of human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in periodontal pockets and the adjacent gingiva of periodontitis lesions. *J Periodontol Res* 2005;40:97-104.

Kubar A, Saygun I, Yapar M, Özdemir A, Slots J. Real-time PCR quantification of cytomegalovirus in aggressive periodontitis lesions using TaqMan technology. *J Periodont Res* 2004;39:81-6.

Landini MP, Lazzarotto T, Ertl PF. Humoral immune response to human cytomegalovirus DNA polymerase. *J Clin Microbiol* 1993 Mar;31(3):724-6.

Li Y, Zhang JC, Zhang YH. The association between infection of Epstein-Barr virus and chronic periodontitis [Chinese]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2004;39:146-8.

Ling LJ, Ho CC, Wu CY, Chen YT, Hung SL. Association between human herpesviruses and the severity of periodontitis. *J Periodontol* 2004 Nov;75(11):1479-85.

Locker D, Slade GD, Murray H. Epidemiology of periodontal disease among older adults: a review. *Periodontol* 2000 1998;16:16-33.

Löe H. The gingival index, plaque index and the retention index system. *J Periodontol* 1967;38:610-6.

Lotufo RFM, Ide L, Contreras A, Bergamashi O, Slots J. Prevalence of subgingival periodontopathic bacteria and herpesvirus in remote native Brazilian population [abstract]. *J Dent Res Special issue* 1998;77:736.

Lupi O, Pereira AC Jr. Herpes simples In: Lupi, O; Silva, AG, Pereira AC, Jr. Herpes: Clínica, Diagnóstico e tratamento. 1ª ed. Rio de Janeiro; 2000. p. 43-70.

Madinier I, Doglio A, Cagnon L, Lefebvre JC, Monteil RA. Epstein-Barr virus DNA detection in gingival tissues of patients undergoing surgical extractions. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1992;30:237-43.

Michalowicz BS, Ronderos M, Silva RC, Contreras A, Slots J. Human Herpes viruses and Porphyromonas gingivalis are Associated with Juvenile Periodontitis. J Periodontol 2000;71;(6): 981 -8.

Mocarski ES, Stinski MF. Persistence of cytomegalovirus genome in human cells. J Virol 1979;31:761-75.

Moghim SH, Chalabi M, Abed AM, Rezaei F, Tamizifar H. Prevalence of Epstein-Barr virus type 1 in patients with chronic periodontitis by nested-PCR. Pak J Biol Sci. 2007 Dec 15;10(24):4547-50.

Monte PD, Lazzarotto T, Ripalti A, Landini MP. Human Cytomegalovirus Infection A Complex Diagnostic Problem in which Molecular Biology Has Induced a Rapid Evolution Intervirology 1996;39:193-203.

Mutimer D, Mirza D, Shaw J, O'Donnell K, Elias E. Enhanced (cytomegalovirus) viral replication associated with septic bacterial complications in liver transplant recipients. Transplantation 1997;63:1411-15.

Myerson D, Hackman RC, Nelson JA, Ward DC, McDougall JK. Widespread presence of histologically occult cytomegalovirus. Hum Pathol 1984;15:430-9.

Nishiyama SA, Nakano V, Velásquez-Melendez G, Avila-Campos MJ. Occurrence of herpes simplex virus 1 and three periodontal bacteria in patients with chronic periodontitis and necrotic pulp. Can J Microbiol 2008 Apr;54(4):326-30.

Ongradi J, Sallay K, Kulcsar G. The decreased antibacterial activity of oral polymorphonuclear leukocytes coincides with the occurrence of virus-carrying oral lymphocytes and epithelial cells. Folia Microbiol (Praha) 1987;32:438.

Page RC, Beck JD. Risk assessment for periodontal diseases. Int Dent J 1997 Apr;47(2):61-87.

Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. Periodontol 2000 1997;14:216–48.

Parra B, Slots J. Detection of human viruses in periodontal pockets using polymerase chain reaction. Oral Microbiol Immunol 1996;5:289 -93.

Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 2001 Jun;183(12):3770-83.

Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol* 2000 2006;42:80-7. Review.

Petersen P, Schneeberger H, Schleibner S, Illner WD, Hofmann GO, Land W. Positive donor and negative recipient cytomegalovirus status is a detrimental factor for long-term renal allograft survival. *Transpl Int*. 1994;7 Suppl 1:S336-8.

Rand KH, Pollard RB, Merigan TC. Increased pulmonary superinfections in cardiac-transplant patients undergoing primary cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* 1978;298:951-3.

Reed WP, Williams RC Jr. Bacterial adherence: first step in pathogenesis of certain infections. *J Chronic Dis* 1978;31:67-72.

Reis MA, Costa RS, Ferraz AS. Causes of death in renal transplant recipients: a study of 102 autopsies from 1968 to 1991. *J R Soc Med* 1995;88:24-7.

Rickinson E, Kieff E. Epstein-Barr virus. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*, 4th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2001:2575–627.

Rodrigues RC. Detecção de *Porphyromonas gingivalis* e vírus do herpes simplex em saliva e placa subgingival de pacientes com doença periodontal [Dissertação de Mestrado]. Instituto de Ciências Biomédicas da USP; 2003.

Rotola A, Cassai E, Farina R, Caselli E, Gentili V, Lazzarotto T, et al. Human herpesvirus 7, Epstein–Barr virus and human cytomegalovirus in periodontal tissues of periodontally diseased and healthy subjects. *J Clin Periodontol* 2008;35:831–7.

Sabeti M, Simon JH, Nowzari H, Slots J. Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus active infection in periapical lesions of teeth with intact crowns. *J Endod* 2003b; 29: 321–3.

Sabeti M, Valles Y, Nowzari H, Simon JH, Kermani-Arab V, Slots J. Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus DNA transcription in endodontic symptomatic lesions. *Oral Microbiol Immunol* 2003a;18:104–8.

Sabiston CB Jr. A review and proposal for etiology of acute necrotizing gingivitis. *J Clin Periodontol* 1986;13:727-34.

Saygun I, Kubar A, Özdemir A, Slots J. Periodontitis lesions are a source of salivary cytomegalovirus and Epstein-Barr virus. *J Periodontal Res*. 2005 Apr;40(2):187-91.

Saygun I, Kubar A, Ozdemir A, Yapar M, Slots J. Herpesviral-bacterial interrelationships in aggressive periodontitis. *J Periodontal Res* 2004a;39:207-12.

Saygun I, Kubar A, Sahin S, Sener K, Slots J. Quantitative analysis of association between herpesviruses and bacterial pathogens in periodontitis. *J Periodontal Res* 2008;43:352-9.

Saygun I, Sahin S, Ozdemir A, Kurtis B, Yapar M, Kubar A, et al. Detection of human virus in patients with chronic periodontitis and the relationship between virus and clinical parameters. *J Periodontol* 2002;73:1437- 43.

Saygun I, Yapar M, Ozdemir A, Kubar A, Slots J. Human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus type I in periodontal abscesses. *Oral Microbiol Immunol* 2004b;19:83-7.

Selinger DS, Reed WP, McLaren LC. Model for studying bacterial adherence to epithelial cells infected with viruses. *Infect Immun* 1981;32:941-4.

Shapira L, Sylvia VL, Halabi A, Soskolne WA, Van Dyke TE, Dean DD, et al. Bacterial lipopolysaccharide induces early and late activation of protein kinase C in inflammatory macrophages by selective activation of PKC-epsilon. *Biochem Biophys Res Commun* 1997 Nov 26;240(3):629-34.

Sheiham A. An epidemiological survey of acute ulcerative gingivitis in Nigerians. *Arch Oral Biol* 1966;11:937-42.

Sjödin B, Crossner C-G, Unell L, Ostlund P. A retrospective radiographic study of alveolar bone loss in the primary dentition in patients with localized juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol* 1989;16:124-7.

Skrepcinski FB, Tetrev S, Rams TE, Sutton B, Contreras A, Slots J. Periodontal disease in Hopi native American teenagers. *J Dent Res* 1997;76 (special issue):439 (abstr 3406).

Slots J. Bacterial specificity in adult periodontitis. A summary of recent work. *J Clin Periodontol* 1986 Nov;13(10):912-7.

Slots J. Herpesviral-bacterial synergy in the pathogenesis of human periodontitis. *Curr Opin Infect Dis* 2007;20:278-83.

Slots J. Herpesviruses in periodontal diseases. *Periodontol* 2000 2005;38:33-62.

Slots J. Herpesviruses, the missing link between gingivitis and periodontitis? *J Int Acad Periodontol* 2004b;6:113-9.

Slots J. Interaction between herpesviruses and bacteria in human periodontal disease. In: Brogden KA. Guthmiller JM, editors. *Polymicrobial Diseases*. Washington, DC: ASM;2002.p.317-31.

Slots J. Subgingival microflora and periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1979;6:351-82.

Slots J. Update on *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease. *J Int Acad Periodontol* 1999 Oct;1(4):121-6. Review.

Slots J. Update on human cytomegalovirus in destructive periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* 2004a;19:217-23.

Slots J, Contreras A. Herpesvirus: a unifying causative factor in periodontitis? *Oral Microbiol Immunol* 2000;15 (5):77-80.

Slots J, Kamma JJ, Sugar C. The herpesvirus - *Porphyromonas gingivalis*-periodontitis axis. *J Periodont Res* 2003;38:318-23.

Slots J, Rams TE. Microbiology of periodontal disease. In: Slots J, Taubman MA, editors. *Contemporary oral microbiology and immunology*. St. Louis: Mosby-Year Book; 1992. p. 425-43.

Slots J, Reynolds HS. Long-wave UV light fluorescence for identification of black-pigmented *Bacteroides* spp. *J Clin Microbiol* 1982 Dec;16(6):1148-51.

Slots J, Saygun I, Sabeti M, Kubar A. Epstein–Barr virus in oral diseases. *J Periodont Res* 2006;41:235–44.

Slots J, Sugar C, Kamma JJ. Cytomegalovirus periodontal presence is associated with subgingival *Dialister pneumosintes* and alveolar bone loss. *Oral Microbiol Immunol* 2002 Dec;17(6):369-74.

Smith JS, Robinson NJ. Age-specific prevalence of infection with herpes simplex virus types 2 and 1: a global review. *J Infect Dis* 2002;186 (Suppl. 1):S3–S28.

Smith MacDonald E, Nowzari H, Contreras A, Flynn J, Morrison JL, Slots J. Clinical and microbiological evaluation of a bioabsorbable and a nonresorbable barrier membrane in the treatment of periodontal intraosseous lesions. *J Periodontol* 1998; 69: 445–53.

Smith RK, Specht EE. Osseous lesions and pathologic fractures in congenital cytomegalic inclusion disease: report of a case. *Clin Orthop* 1979;144:280-3.

Socransky SS, Haffajee AD. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol* 2000 1994;5:7–25.

Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol* 1992 Apr;63(4 Suppl):322-31.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998 Feb;25(2):134-44.

Sugano N, Ikeda K, Oshikawa M, Idesawa M, Tanaka H, Sato S, et al. Relationship between *Porphyromonas gingivalis*, Epstein-Barr virus infection and reactivation in periodontitis. *J Oral Sci* 2004 Dec; 46(4):203-6.

Suguihara RT. Detecção de *Prevotella intermedia/nigrescens* e herpes vírus em saliva e placa subgingival de pacientes com doença periodontal [Dissertação de Mestrado]. Instituto de Ciências Biomédicas da USP; 2004.

Sunde PT, Olsen I, Enersen M, Beiske K, Grinde B. Human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in apical and marginal periodontitis: a role in pathology? *J Med Virol* 2008b Jun;80(6):1007-11.

Sunde PT, Olsen I, Enersen M, Grinde B. Patient with severe periodontitis and subgingival Epstein–Barr virus treated with antiviral therapy. *J Clin Virol* 2008a Jun;42(2):176-8. Epub 2008a Mar 4.

Syrjänen S, Leimola-Virtanen R, Schmidt-Westhausen A, Reichart PA. Oral ulcers in AIDS patients frequently associated with cytomegalovirus (CMV) and Epstein-Barr virus (EBV) infections. *J Oral Pathol Med* 1999;28:204–9.

Tanikawa, KL, Rodrigues RC, Suguihara RT, Lotufo RFM, Simionato MRL, Cai, S, et al. Co-infection of herpesvirus and periodontal pathogenic bacteria in periodontal pockets virus *Rev Res* 2001; 6, (suppl. 1):122. res. HS21,.

Tanner AC, Dzink JL, Socransky SS, Des Roches CL. Diagnosis of periodontal disease using rapid identification of "activity-related" gram-negative species. *J Periodont Res* 1987 May;22(3):207-8.

Tantivanich S, Laohapand P, Thaweeboon S, Desakorn V, Wuthinuntiwong P, Chalermtaranukul S, et al. Prevalence of cytomegalovirus, human herpesvirus-6, and Epstein-Barr virus in periodontitis patients and healthy subjects in the Thai population. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2004 Sep;35(3):635-40.

Tateishi K, Toh Y, Minagawa H, Tashiro H. Detection of Herpes simplex virus (HSV) in the saliva from 1,000 oral surgery outpatients by the polymerase chain reaction (PCR) and virus isolation. *J. Oral Pathol Med* 1994;23:80-4.

Teughels W, Sliepen I, Quirynen M, Haake SK, Van Eldere J, Fives-Taylor P, Van Ranst M. Human cytomegalovirus enhances *A. actinomycetemcomitans* adherence to cells. *J Dent Res* 2007 Feb;86(2):175-80.

Teughels W, Vanranst M, Pauwels M, Dierickx K, van Steenberghe D, van Eldere J, Quirynen M. Effects of human cytomegalovirus infection on epithelial adhesion by periodontopathogens. *Pan-European IADR*; 2002.

Ting M, Contreras A, Slots J. Herpesviruses in localized juvenile periodontitis. *J Periodont Res* 2000;35:17-25.

Tsurumi T, Maeno K, Nishiyama Y. Nucleotide sequence of the DNA polymerase gene of herpes simplex virus type 2 and comparison with the type 1 counterpart. *Gene* 1987;52:129-37.

Tyler, KL, Fields, BN. Pathogenesis of viral infections. In: Fields BN; Knipe, DM; Howley P M, editors Fields virology. Philadelphia: Lippincott- Raven; 1996.p 173-218.

Umeda M, Chen C, Bakker I, Contreras A, Morrison JL, Slots J. Risk indicators for harboring periodontal pathogens. J Periodontol 1998 Oct;69(10):1111-8.

Välimaa H, Waris M, Hukkanen V, Blankenvoorde MF, Nieuw Amerongen AV, Tenovuo J. Salivary defense factors in herpes simplex virus infection. J Dent Res 2002 Jun;81(6):416-21.

Velazco CH, Coelho C, Salazar F, Contreras A, Slots J, Pacheco JJ. Microbiological features of Papillon-Lefevre syndrome periodontitis. J Clin Periodontol 1999;26:622–7.

Waner JL. Human cytomegalovirus. In: Specter S, Bendinelli M, Friedman H, editors. Virus-induced immunosuppression. New York: Plenum Press; 1989:p.101-16.

Wara-Aswapati N, Boch JA, Auron PE. Activation of interleukin 1b gene transcription by human cytomegalovirus – Molecular mechanisms and relevance to periodontitis. Oral Microbiol Immunol 2003;18:67–71.

Watanabe SA, Correia-Silva J de F, Horta MC, Costa JE, Gomez RS. EBV-1 and HCMV in aggressive periodontitis in Brazilian patients. Braz Oral Res 2007 Oct-Dec;21(4):336-41.

Wu YM, Yan J, Ojcius DM, Chen LL, Gu ZY, Pan JP. Correlation between infections with different genotypes of human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in subgingival samples and periodontal status of patients. J Clin Microbiol 2007;45:3665-70.

Yapar M, Saygun I, Ozdemir A, Kubar A, Sahin S. Prevalence of human herpesviruses in patients with aggressive periodontitis. J Periodontol 2003;74:1634–40.

Yildirim S, Yapar M, Kubar A. Detection and quantification of herpesviruses in Kostmann syndrome periodontitis using real-time polymerase chain reaction: a case report. Oral Microbiol Immunol 2006 Apr;21(2):73-8.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

2ª. via

PARECER DE APROVAÇÃO Protocolo 24/05

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa, APROVOU o protocolo de pesquisa "Detecção do Herpes simples vírus, Citomegalovírus e Epstein Barr vírus em bolsas periodontais de pacientes com Periodontite crônica" de responsabilidade do Pesquisador Osmar Shizuo Okuda, sob orientação do Professor Doutor Fábio Daumas Nunes.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 13 de agosto de 2008

Prof. Dr. João Guaberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Estas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, cujo objetivo é avaliar a possível associação entre a presença de vírus e doenças na gengiva de em uma população brasileira jovem.

As doenças nas gengivas em adolescentes e adultos jovens são caracterizadas por uma significativa e rápida destruição dos tecidos ao redor dos dentes.

Os estudos da literatura mostram que alguns vírus, como o herpes simples vírus, o citomegalovírus e o Epstein-Barr vírus podem estar associados à presença de doença periodontal. O objetivo deste trabalho é identificar a presença destes vírus em pacientes saudáveis e com doença na gengiva.

Para tanto o (a) senhor(a) será avaliado por um dentista especialista em gengiva e serão feitos exames clínicos e radiográficos. No exame clínico, será usado um instrumento para medir o espaço entre o dente e a gengiva, e o(a) senhor(a) poderá sentir algum desconforto e sangramento na gengiva. A região poderá ficar um pouco dolorida por alguns minutos. O exame radiográfico constará de 14 radiografias. Durante o exame radiográfico, o(a) senhor (a) poderá sentir algum desconforto ou náusea. A exposição do sr(a) à radiação será mínima, porque será utilizado avental de chumbo para proteção, filmes radiográficos ultra-rápidos e o aparelho de raio-X será regulado de modo que a dose de radiação seja mínima.

Também será coletada amostra da bolsa periodontal ou sulco gengival, empregando-se cones de papel estéreis. Estes cones ficarão no interior da bolsa por aproximadamente 30 segundos, e, eventualmente, algum desconforto poderá ocorrer.

Esta pesquisa não auxiliará diretamente no seu tratamento da gengiva, mas os resultados poderão ser úteis para o entendimento da doença da gengiva e para futuros tratamentos.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Osmar Shizuo Okuda, que pode ser encontrada na Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, telefone: 3091-7833. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Diante de eventuais danos decorrentes desta pesquisa o Sr(a) deverá entrar em contato com o Departamento de Estomatologia – Disciplina de Periodontia da Faculdade do Odontologia da Universidade de São Paulo- telefone: 3091-7833.

É garantida a liberdade de retirar-se do estudo a qualquer momento o estudo sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente (nome ou dados pessoais).

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

O pesquisador se compromete a utilizar os dados coletados somente para esta pesquisa.

Eu, _____, portador do RG_____ acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo.

Discuti com o Dr. Osmar Shizuo Okuda sobre a minha decisão em participar do estudo. Ficaram claros para mim os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimento permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar

o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido ou no meu atendimento neste serviço.

Assinatura do paciente/ representante legal data / /

Assinatura da testemunha data / /

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Dr. Osmar Shizuo Okuda
Investigador Principal