SABRINA ROSA GRANDE

**Detecção e associação de herpes vírus e bactérias periodontopatogênicas em
pacientes HIV positivos com doença periodontal**

São Paulo

2011

SABRINA ROSA GRANDE

**Detecção e associação de herpes vírus e bactérias periodontopatogênicas em
pacientes HIV positivos com doença periodontal**

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

2011

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.

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

Grande, Sabrina Rosa

Detecção e associação de herpes vírus e bactérias periodontopatogênicas em pacientes HIV positivos com doença periodontal / Sabrina Rosa Grande; orientador Luiz A. P. A. de Lima. -- São Paulo, 2011.

69p. : Tab., graf.; 30 cm.

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

1. Herpesviridae - HIV. 2. Doença periodontal. I. Lima, Luiz A. P. A. de. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Grande SR. Detecção e associação de herpes vírus e bactérias periodontopatogênicas em pacientes HIV positivos com doença periodontal. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /2011

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à minha família que tanto amo. Talvez fosse mais fácil escrever essa dedicatória há poucos meses atrás, antes de minha mãe se encontrar na espiritualidade, porém, a emoção desse momento é muito mais grandiosa. Com certeza é uma dedicatória do fundo da alma.

Falar da minha mãe, Sandra, é lembrar de todo o cuidado, dedicação, amor, preocupação e incentivo nas horas de trabalho. É falar de coragem, força, garra, e ao mesmo tempo, preocupação, dúvidas e incertezas. É tudo em uma só pessoa. Dedico essa tese a ela que é uma dos meus maiores exemplos.

Ao meu pai, Hamilton, que me é a força de todas as horas. É quem me proporcionou voar cada vez mais alto e mostrou que sempre é possível chegar lá. É quem me mostrou o caminho da responsabilidade, da educação, dos princípios, da humildade e do amor. Te amo muito e sou eternamente agradecida por ser sua filha.

Ao meu irmão, Hamilton Jr., que tanto amo. É um grande incentivador do meu crescimento e compartilha todos os meus momentos com muita alegria. É mais que um irmão, é um grande amigo.

À minha irmã, Fabiana, que mesmo dez anos mais nova, me ensina a cada dia. É exemplo de força e alegria. É minha companheira e amiga. Obrigada por estar sempre ao meu lado. Te amo muito!

Ao meu noivo, Ivo, que mais que ninguém, soube me entender dia a dia. Fez-me rir nos momentos mais difíceis e estressantes. Foi essencial na minha vida, acompanhou, incentivou e vibrou com todas as minhas conquistas. Esteve presente nos momentos que eu mais precisei. Te amo muito e agradeço por tudo.

Aos meus professores e colegas de trabalho, pelo incentivo, orientação e dedicação. Meus agradecimentos por todos os ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

À **Deus** que eu agradeço todo dia.

Aos meus familiares e amigos.

Ao meu orientador, **Prof. Assoc. Luiz Antonio Pugliesi Alves de Lima**, por ter acreditado no meu trabalho. Obrigada pela orientação, apoio, críticas, estímulo e por sempre me fazer acreditar ser capaz.

Ao **Prof. Dr. Roberto Fraga Moreira Lotufo (*in memoriam*)**, que a princípio seria meu orientador. Agradeço pela sua confiança, estímulo e apoio.

À **Dra. Ana Vitória Imbronito**, que me despertou para a trajetória acadêmica desde a Iniciação Científica. Foi uma pessoa de grande importância no meu curso de Mestrado. Agradeço pela orientação na metodologia, análise estatística e redação dos artigos.

Ao **Prof. Assoc. Fábio Daumas Nunes**, pelos ensinamentos e pela orientação. Agradeço pela disponibilização do laboratório de Patologia Molecular.

Ao amigo mestre **Osmar Shizuo Okuda**, pela paciência em ajudar não apenas na metodologia do trabalho e no laboratório, mas em todas as etapas do meu curso de Mestrado.

À **Dra Nívea Maria de Freitas** que participou deste trabalho com muita dedicação e me orientou na fase laboratorial do projeto.

Ao **Prof. Dr. Cláudio Mendes Pannuti**, pela orientação, dedicação e por ter participado da minha qualificação. Agradeço pela tarefa de realizar as análises estatísticas.

À **Prof. Dra. Marina Helena Cury Gallottini Magalhães**, pela disposição em ensinar e por participar da minha qualificação. Agradeço por disponibilizar o Centro de Atendimento a Pacientes Especiais (CAPE).

À **Prof. Dra. Karen López Ortega** por disponibilizar o Centro de Atendimento a Pacientes Especiais.

Ao **Prof. Titular Francisco Emílio Pustiglioni** por todos os ensinamentos e palavras. Foi muito importante para o meu crescimento profissional.

Aos Professores da Disciplina de Periodontia da FOU SP, **Prof. Dr. Cesário Antonio Duarte, Prof. Assoc. Giorgio de Micheli, Prof. Dr. Giuseppe Alexandre Romito, Prof. Emérito José Hildebrando Todescan, Prof. Dr. Koto Nakae, Prof. Dr. Marco Antônio P. Georgetti, Profa. Dra. Marina Clemente Conde, Prof. Dr. João Batista César Neto, Prof. Dra. Marinella Holzhausen, e Prof. Dra. Luciana Saraiva de Campos** pelos ensinamentos durante todo o curso de mestrado. Obrigada por toda dedicação.

Às minhas amigas da turma de mestrado: **Caroline Gomes Paixão, Ecilene Francisca Rosa, Isabela Maria Porto Araújo Britto, Juliana Cleaver Aun, Luciana Ávila Maltagliati.**

Aos amigos que cursaram o mestrado juntos: **Osmar S. Okuda, Rodrigo A. B. dos Santos, Rodrigo Carlos. N. C. Pinto e Marcio Seto Yu Yuen.**

À todos os colegas do curso de pós-graduação pela amizade e companheirismo.

Aos colegas do laboratório de Patologia molecular (LPM) coordenado pelo **Prof. Dr. Fábio 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 Osmar Shizuo Okuda, Silvia Linard Marcelino e Thais Acquafreda Antunes** pelo auxílio e dedicação.

Aos colegas do Centro de Atendimento a Pacientes Especiais (CAPE)

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**, à secretária do Departamento de Estomatologia **Vera Lúcia Cordeiro dos Santos Almeida** e às secretárias do **CAPE** agradeço pela colaboração.

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.

Aos pacientes que gentilmente concordaram em participar deste estudo.

À **FAPESP**, pelo auxílio à pesquisa

À **CAPES**, pela bolsa de mestrado.

Agradeço a todos que, de alguma forma, participaram da elaboração deste projeto.

RESUMO

Grande SR. Detecção e associação de herpes vírus e bactérias periodontopatogênicas em pacientes HIV positivos com doença periodontal [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011.

Herpes vírus humanos são patógenos amplamente distribuídos na população mundial e, recentemente, tem se estudado um possível envolvimento desses vírus na etiologia da doença periodontal. Indivíduos HIV positivos (HIV+) têm mostrado uma maior prevalência desses vírus e, a imunossupressão induzida pelo HIV é conhecida por facilitar a reativação desses microorganismos. Desse modo, o presente estudo teve como objetivo determinar a presença dos vírus Herpes simples 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* (*A. actinomycetemcomitans*), *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) e *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*) em pacientes HIV+ com doença periodontal. Foram coletadas amostras de placa subgengival, saliva e sangue capilar de vinte e sete indivíduos HIV+ com periodontite crônica (HIV-p) e 23 indivíduos HIV+ com gengivite (HIV-g). A detecção das espécies bacterianas e dos herpes vírus foi realizada pela técnica de Reação em cadeia da polimerase (PCR) e Nested PCR, respectivamente. A análise estatística mostrou que para o grupo HIV-p, EBV-1 e *T. forsythia* apresentaram maior prevalência nas amostras de placa subgengival (70.4% e 51.8%, respectivamente) e saliva (81.5%, 40.7%, respectivamente) do que no sangue (22% e 0, respectivamente) ($p<0.005$ e $p<0.0001$, respectivamente). A bactéria *P. gingivalis* foi mais freqüente na placa subgengival (77.7%) em relação à saliva (25.9%) e sangue (25.9%) ($p<0.0001$). No grupo HIV-g, *P. gingivalis* e HCMV apresentaram maior freqüência na placa subgengival (95.6% e 91.3%, respectivamente) do que na saliva (21.8% e 65.2, respectivamente) e sangue (17.4% e 60.86%, respectivamente) ($p<0.0001$ e $p=0.004$, respectivamente). *T.forsythia* e EBV-1 foram detectados com maior freqüência na placa subgengival (47.8%, 78.3%, respectivamente) e saliva (52.2%, 52.2%, respectivamente) do que no sangue (8.7%

e 13%, respectivamente) ($p=0.004$ e $p<0.005$, respectivamente). *A.actinomycescomitans* e HSV-1 foram detectados com frequências similares nas três amostras nos dois grupos. Não houve associação entre coinfeção de herpes vírus e patógenos periodontais e doença periodontal em pacientes HIV+ com doença periodontal. Na saliva de pacientes HIV+ houve associação entre EBV-1, e coinfeção viral por EBV-1 e HCMV com a doença periodontal.

Palavras-chave: Herpesviridae. Periodontite. Gengivite. HIV. Saliva. Placa subgengival. Sangue

ABSTRACT

Grande SR. Detection and association of herpesviruses and periodontal pathogens in HIV positive patients with periodontal disease [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011.

Herpesviruses are human pathogens widely distributed in the population and, recently, it has been studied a possible involvement of these viruses in the etiology of periodontal disease. HIV positive individuals (HIV+) have shown a higher prevalence of these viruses and the HIV-induced immunosuppression is known to facilitate the reactivation of these microorganisms.

Thus, this study aimed to determine the presence of Herpes simplex virus type 1 (HSV-1), Cytomegalovirus (HCMV) and Epstein-Barr virus type 1 (EBV-1), relating to the presence of the periodontopathogens: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) and *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*) in HIV+ individuals with periodontal disease. Samples were collected from subgingival plaque, saliva and capillary blood from twenty-seven HIV+ subjects with chronic periodontitis (HIV-p) and 23 HIV+ patients with gingivitis (HIV-g). The detection of bacterial species and herpesviruses were identified by Polymerase chain reaction (PCR) and nested PCR respectively. Statistical analysis showed that for HIV-p group, EBV-1 and *T. forsythia* presented higher detection in subgingival plaque (70.4% and 51.8%, respectively) and saliva (81.5%, 40.7%, respectively) than in blood (22%, 0, respectively) ($p < 0.005$ e $p < 0.0001$, respectively). *P. gingivalis* was more frequent in subgingival plaque (77.7%) than saliva (25.9%) and blood (25.9%) ($p < 0.0001$). In the HIV-g, *P. gingivalis* and HCMV presented higher frequency in the subgingival plaque (95.6% and 91.3%, respectively) than in saliva (21.8% e 65.2, respectively) and blood (17.4% e 60.86%, respectively) ($p < 0.0001$ e $p = 0.004$). *T. forsythia* and EBV-1 were detected more frequently in the subgingival plaque (47.8%, 78.3%, respectively) and saliva (52.2%, 52.2%, respectively) than in blood ($p = 0.004$ and $p < 0.005$, respectively). *A. actinomycetemcomitans* and HSV-1 were detected with similar frequencies among the three samples in the two groups. There was no association between coinfection of herpesviruses and periodontal pathogens and periodontal disease in HIV patients

with periodontal disease. In saliva of HIV patients there was no association between EBV-1, and viral coinfection by EBV-1 and HCMV, with periodontal disease.

Keywords: Herpesviridae. Periodontitis. Gingivitis. HIV. Saliva. Dental plaque. Blood.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 5.1 - Distribuição dos pacientes de acordo com a doença periodontal e a presença das bactérias periodontopatogênicas nas amostras de saliva, placa subgengival e sangue43
- Figura 5.2 - Distribuição dos pacientes de acordo com a doença periodontal e a presença de herpes vírus nas amostras de saliva, placa subgengival e sangue43

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Identificação dos iniciadores, temperatura de anelamento, comprimento do produto e referência	38
Tabela 5.1 - Descrição dos dados demográficos, clínicos e imunológicos dos pacientes HIV positivos com periodontite e gengivite	39
Tabela 5.2 - Frequência de EBV-1, HCMV, HSV-1 e periodontopatógenos nas amostras de saliva, sangue e placa subgengival no grupo HIV-g.....	41
Tabela 5.3 - Frequência de EBV-1, HCMV, HSV-1 e periodontopatógenos nas amostras de saliva, sangue e placa subgengival no grupo HIV-p... ..	42
Tabela 5.4 - Distribuição dos pacientes de acordo com a doença periodontal e a presença de diferentes vírus nas amostras de saliva, placa subgengival e sangue.....	44
Tabela 5.5 - Distribuição dos pacientes de acordo com CD4 e presença de vírus na saliva, placa subgengival e sangue.....	45
Tabela 5.6 - Distribuição dos pacientes de acordo com CD4 e presença de bactérias na saliva, placa subgengival e sangue	46
Tabela 5.7 - Frequência de coinfeção de herpes vírus e bactérias na placa subgengival dos grupos periodontite e gengivite.....	47
Tabela 5.8 - Frequência de associação entre vírus e bactérias com relação à doença periodontal nas amostras de placa subgengival.....	47

Tabela 5.9 - Frequência de associação entre vírus e bactérias com relação à doença periodontal nas amostras de sangue.....	48
--	----

Tabela 5.10 -Frequência de associação entre vírus e bactérias com relação à doença periodontal nas amostras de saliva	49
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Unidade de medida referente a 1 micrograma
µl	Unidade de medida referente a 1 microlitro
A.	
<i>Actinomyces comitans</i>	<i>Agregatibacter actinomyces comitans</i>
ATCC	“American type culture collection”
BCFR1	Proteína imunossupressora do EBV
BNLF2a	Proteína da fase lítica do EBV
BZLF1	Proteína transativadora do EBV
C-	Controle negativo
C+	Controle positivo
CAPE	Centro de Atendimento a Pacientes Especiais
CD4	Célula de defesa (Linfócito T CD4)
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
EGL	Eritema gengival linear
et al. “et alii”	Referência em latim que significa “e outros”
g	Unidade de medida referente a 1 grama
GUN	Gengivite ulcerativa necrosante
HAART	Terapia antiretroviral altamente ativa
HCMV	Citomegalovírus humano
HHV-6	Herpes vírus tipo 6
HHV-7	Herpes vírus tipo 7
HHV-8	Herpes vírus tipo 8
HHVs	Herpes vírus humanos
HIV	Vírus da imunodeficiência humana

HIV+	Vírus da imunodeficiência humana positivo
HIV-g	Indivíduo HIV positivo com gengivite
HIV-p	Indivíduo HIV positivo com periodontite
HSV	Herpes simples vírus
HSV-1	Herpes simples vírus tipo 1
IP	Índice de placa
ISS	Índice de sangramento à sondagem
Kbp	Pares de kilobases
KCl	Cloreto de potássio
M	Molar
mA	Miliampere
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
ml	Unidade de medida referente a 1 mililitro
mM	Unidade de medida referente a 1 milimolar
mm	Unidade de medida referente a 1 milímetro
mm ³	Unidade de medida referente a 1 milímetro cúbico
NCI	Nível clínico de inserção
Nested PCR	“Nested polimerase chain reaction”
Ng	Unidade de medida referente a 1 nanograma
NK	Célula Natural Killer
nM	Nanomolar
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>P. intermedia</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>P. nigrescens</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>
Pb	Pares de base
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCS	Profundidade clínica de sondagem
PGE2	Prostaglandina E2
pH	Potencial hidrogeniônico
PM	Unidade de medida referente a 1 picomolar
Pmoles	Picomoles
PUN	Periodontite ulcerativa necrosante

Receptores Fc	Moléculas encontradas na superfície de algumas células, que reconhecem e combinam-se com a porção Fc (cristalizável) das moléculas de imunoglobulinas.
Rpm	Rotações por minuto
<i>T. denticola</i>	<i>Treponema denticola</i>
<i>T. forsythia</i>	<i>Tannerella forsythia</i>
TAE	“Tris-Acetate EDTA buffer”
TE Tris- EDTA	“Ethylenediamine Tetra acetic Acid; buffered solution” solução de Tris e EDTA
Th1	Célula T helper 1
Th2	Célula T helper 2
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
W	Watts

LISTA DE SÍMBOLOS

+	Positivo
%	Por cento
β	Beta
α	Alfa
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	22
3 PROPOSIÇÃO	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
5 RESULTADOS.....	39
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS.....	55
ANEXOS.....	65

1 INTRODUÇÃO

Estudos sobre o sinergismo entre vírus e bactérias relatam uma maior patogenicidade das bactérias envolvidas nos complexos infecciosos (Bakaletz, 1995). Lesões periodontais infectadas por herpes vírus tendem a apresentar níveis elevados de bactérias periodontopatogênicas (Contreras et al., 1999; Ting et al., 2000; Slots et al., 2002; Slots et al., 2003; Saygun et al., 2004). Epstein-Barr-1 (EBV-1) e Citomegalovírus humano (HCMV) foram associados à ocorrência elevada dos patógenos *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*), *Prevotella intermedia* (*P. Intermedia*), *Prevotella nigrescens* (*P. nigrescens*), *Treponema denticola* (*T. denticola*) e outros patógenos periodontais (Contreras et al., 1999; Slots et al., 2002; Slots et al., 2003; Saygun et al., 2004). EBV-1 (Saygun et al., 2008; Sunde et al., 2008) e HCMV (Michalowicz et al., 2000; Ting et al., 2000; Nowzari et al., 2001; Imbronito et al., 2008) também têm sido relacionados à presença subgingival do periodontopatógeno *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. Actinomycetemcomitans*). Herpes simples vírus-1 (HSV-1), em combinação com *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. intermedia* e *A. actinomycetemcomitans* tem sido associado à periodontite crônica (Imbronito et al., 2008).

Alguns autores, baseados em estudos *in vitro* e estudos transversais, sugerem que os herpes vírus podem contribuir para a destruição periodontal como resultado direto da infecção e replicação do vírus, ou como resultado de uma alteração da defesa do hospedeiro (Contreras; Slots, 2000; Wara-Aswapati et al., 2003). Infecção ativa pelos herpes vírus pode ser parcialmente responsável pelo aumento do nível gengival de interleucina-1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) (Baqui et al., 2000). Além disso, é sugerido que a infecção pelos herpes vírus pode reduzir significativamente as células envolvidas na defesa periodontal do hospedeiro, propiciando um crescimento excessivo de bactérias periodontopatogênicas (Contreras; Slots, 2000).

Os herpes vírus podem predispor às infecções secundárias por produzir anticorpos contra neutrófilos e neutropenia, e pela indução de anormalidades na aderência, quimiotaxia, fagocitose, atividades oxidativas, secretoras, e bactericidas dos leucócitos polimorfonucleares (Abramson; Mills, 1988;

Slots, 2010). Leucócitos polimorfonucleares parecem exibir quimiotaxia e capacidade bactericida menos eficientes em pacientes com periodontite associada a herpes vírus subgengivais do que em indivíduos livres de herpes vírus (Contreras; Slots, 2000).

Estudos sobre a relação entre os herpes vírus e doença periodontal em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV+) são escassos. A infecção pelo HIV está associada a um risco aumentado de infecção por herpes vírus e suas doenças relacionadas como o sarcoma de Kaposi, linfoma não-Hodgkin e leucoplasia pilosa oral. A imunossupressão do HIV é conhecida por facilitar a reativação de herpes vírus, que podem interagir com o HIV a nível celular e molecular e aumentar a taxa de destruição dos tecidos periodontais (Ho et al., 1990; Griffiths, 1996; Miller, 1996). Indivíduos HIV positivos (HIV+) apresentaram doença periodontal caracterizada por maior prevalência das formas necrosantes da doença em relação à indivíduos HIV negativos (Winkler, 1987) e microbiota periodontopática similar à dos pacientes HIV negativos, porém, com maior prevalência de microorganismos oportunistas (Murray et al., 1989; Zambon et al., 1990; Murray et al., 1991; Rams et al., 1991; Moore et al., 1993; Tenenbaum et al., 1997; Nakou et al., 1997; Teanpaisan et al., 2001). A periodontite crônica em indivíduos HIV+ parece estar relacionada com um aumento na perda de inserção ao longo do tempo (Lucht et al., 1991; Yeung et al., 1993; Tomar et al., 1995; Ndiaye et al., 1997; Mckaig et al., 2000), podendo haver uma possível relação entre a imunossupressão do HIV, o aumento de herpes vírus e periodontopatógenos, e a periodontite crônica de progressão mais rápida nesses indivíduos. Apenas dois estudos relacionaram os vírus EBV-1, HCMV e HSV-1 e a doença periodontal em indivíduos HIV+ (Contreras et al., 2001; Grande et al., 2008). HCMV foi o vírus mais prevalente no tecido gengival de pacientes HIV+ com periodontite associada ao HIV (81%) (Contreras et al., 2001). EBV-1 foi encontrado com maior frequência na saliva (62%) e placa subgengival (72%) de pacientes HIV positivos em relação a indivíduos HIV negativos com periodontite crônica e o HSV-1 foi encontrado com menor frequência nas amostras estudadas (Grande et al., 2008).

Baseado na literatura estudada, nenhum estudo investigou a associação dos herpes vírus EBV-1, HCMV e HSV-1 com periodontopatógenos em indivíduos HIV+ com doença periodontal. Assim, o objetivo do presente estudo foi verificar a presença e associação entre os herpes vírus e patógenos periodontais em

indivíduos

HIV+

com

doença

periodontal.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Mecanismos patogênicos dos herpes vírus e doença periodontal

A periodontite é uma doença infecciosa que envolve bactérias específicas (Socransky; Haffajee, 1992), mecanismos imunológicos relacionados aos hospedeiros e fatores ambientais. 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 como, destruição localizada e padronizada na maioria dos pacientes, desarranjo bilateral simétrico e exacerbação intermitente da doença em determinados dentes (Saygun et al., 2002; Slots et al., 2002; Slots et al., 2003). Recentemente têm se estudado um possível envolvimento de herpes vírus na etiopatogenia da doença periodontal sendo os trabalhos do grupo de Parra e Slots (1996) os pioneiros nessa linha de pesquisa. Os tipos mais freqüentes de herpes vírus associados à doença periodontal são o EBV-1, HCMV, e, em menor escala o HSV-1 e os herpes vírus humano HHV-6, HHV-7 e HHV-8 (Contreras; Slots, 1996).

Segundo Slots e Contreras (2000) a alternância entre a fase de latência e ativação da infecção por herpes vírus no periodonto pode levar a imunossupressão local transitória e dessa forma explicar em parte, a natureza progressiva episódica da periodontite humana, com períodos de agudização e períodos de remissão dos sinais e sintomas. Tem sido proposto que infecções por herpes vírus podem agir na patogênese da doença periodontal diretamente através de efeitos citotóxicos sobre os fibroblastos, osteoblastos e células inflamatórias, assim como indiretamente através de alterações na resposta humoral e celular (Contreras; Slots, 2000; Wara-Aswapati et al., 2003; Slots, 2010).

Os herpes vírus apresentam estratégias para evadir da defesa do hospedeiro e intensificar a inflamação tecidual (Reyburn et al., 1997; Powers; Fru, 2008; Slots, 2010). O HCMV apresenta um tamanho de aproximadamente 150 a 200nm, é envelopado e possui fita dupla de 240 kb que codifica 35 proteínas. Infecta principalmente os monócitos e macrófagos periodontais e menos frequentemente os

linfócitos T (Contreras et al., 1999). A infecção pelo HCMV pode induzir anormalidades na aderência, quimiotaxia e atividades fagocíticas, oxidativas, secretórias e bactericidas de neutrófilos polimorfonucleares (Soderberg-Naucler, 2006). Segundo Soderberg-Naucler (2006) HCMV diminui expressão dos antígenos HLA classes 1 e 2 nas células T e células apresentadoras de antígenos (APCs). Produz um homólogo de HLA classe 1 que interfere na apresentação de antígeno pelas células infectadas bloqueando o reconhecimento por células T e NK (Reyburn et al., 1997). A infecção por HCMV aumenta a produção de IL-1 β e TNF- α de monócitos e macrófagos (Mackowiack et al., 1984) cuja produção aumentada pode estar associada à maior suscetibilidade à doença periodontal. Segundo Wara-Aswapati et al. (2003) IL-1 β e TNF- α podem aumentar a produção de metaloproteinases e mediar a destruição óssea periodontal. Segundo Redpath et al. (1999), o HCMV pode driblar o sistema imune do hospedeiro induzindo a secreção antecipada de IL-10 pelos monócitos, o que inibe a expressão de MHC classe II. O HCMV também possui o potencial de suprimir a função antígeno específica de linfócitos T citotóxicos e diminuir o seu número, alterações estas que correspondem à diminuição local ou generalizada das células de defesa (Heurilin et al., 1991). Similar a infecções médicas (Bakaletz, 1995) a infecção gengival por herpes vírus parece promover ligação e colonização subgengival de bactérias periodontopatogênicas. Teughels et al. (2007) em um estudo in vitro confirmou a hipótese de que a aderência de *A. actinomycetemcomitans* é influenciada por HCMV. Células Hela e células epiteliais mostraram ser semi-permissivas para HCMV com conseqüente aumento da aderência bacteriana. Segundo Mackowiak et al. (1984) proteínas expressas por herpes vírus nas membranas celulares de células eucarióticas podem atuar como sítios de ligação bacteriana.

EBV-1 pertence ao grupo do herpes vírus tipo 4 e infecta aproximadamente 90% da população adulta mundial (Rickinson; Kieff 1996). Infecta principalmente dois tipos de células: as células linfóides e epiteliais (Rickinson; Kieff, 2001). É principalmente transmitido pela troca de saliva infectada e inicia a infecção na orofaringe (Contreras et al., 1999). Segundo Rosen et al. (1977), o EBV-1 é um potente ativador policlonal de linfócitos B, capaz de induzir a proliferação e a diferenciação de células secretoras de imunoglobulinas, que podem estar associadas à progressão da doença periodontal (Seymor, 1987). O EBV –1 codifica uma proteína, a BCFR1, que se assemelha estruturalmente e funcionalmente à

interleucina 10 (IL-10) (Taga et al., 1995). IL-10 suprime a produção de Interleucina-2, Interferon- γ e linfotóxina, polarizando o sistema à uma resposta tipo T helper 2 (Th2) (Rosen et al., 1977; Stashenko et al., 1987). De acordo com Seymor (1987), uma resposta tipo T helper 1 (Th1) está associada à proteção contra a doença periodontal; enquanto que a resposta tipo Th2, à progressão da doença. Os linfócitos B infectados pelo EBV geralmente não são destruídos por linfócitos T e por células natural Killer (NK), podendo permanecer em repouso ou replicar, sem serem eliminados por meio destas células. É provável que a regulação negativa da proteína classe I do complexo de imunohistocompatibilidade (MHC), nas células infectadas, seja um dos principais responsáveis pelo mecanismo de escape de sua destruição (Li et al., 1995). Segundo Croft et al. (2009), EBV codifica a proteína BNLF2a, que se expressa na fase inicial de replicação lítica e inibe funções dos transportadores associados ao processamento de antígeno. Expressão ectópica de BNLF2a causa diminuição da expressão de MHC classe I e inibe a apresentação de antígenos para células T CD8. Quando o vírus se liga à superfície celular, as células são ativadas e entram no ciclo celular (Rickinson; Kieff, 2001). Posteriormente ocorre expressão de alguns genes do EBV, e as células são capazes de proliferar indefinidamente, expressando funções diferenciadas como a produção de imunoglobulinas e expressão de produtos de ativação das células-B – como, por exemplo, CD23 –, bem como antígenos do complexo EBNA e duas proteínas de membrana do estado latente, LMP1 e LMP2 (Strauss et al., 1993). O EBV pode se imortalizar nos linfócitos-B, provavelmente porque passa a expressar apenas EBNA1, que não gera resposta aos linfócitos-T citotóxicos, de maneira que o vírus permanece irreconhecível ao sistema imune durante sua existência (Rickinson; Kieff, 2001).

Baseado nos estudos sobre a patogenia e prevalência dos vírus, Slots e Contreras (2000) propuseram uma hipótese de associação entre herpes vírus e bactérias na periodontite. Inicialmente, a gengivite, iniciada pelas bactérias no biofilme dental, permite que células inflamatórias infiltrem no periodonto. Em resposta a infecção ativa dos herpes vírus, uma resposta imune mediada por células T CD8 é desencadeada. Esses vírus, então, executam estratégias de evasão da resposta imune como desintegração de componentes do MHC e interferem na apresentação de antígenos. A atuação conjunta da resposta imune do hospedeiro e a resposta mediada pelos herpes vírus resultam em um aumento das citocinas pró-inflamatórias com conseqüente ativação de osteoclastos e diminuição da resposta

mediada por anticorpos contra espécies bacterianas. O aumento de bactérias e de sua patogenicidade promove mecanismos adicionais de destruição periodontal. O tropismo de determinados sítios pelos herpes vírus pode explicar porque a destruição do tecido periodontal pode diferir de dente para dente ou superfície para superfície em um mesmo indivíduo. Em adição, uma defesa efetiva contra herpes vírus permite prolongado período de estabilidade periodontal mesmo na presença de periodontopatógenos enquanto a reativação do estado de latência desses vírus pode causar aumento da destruição periodontal e progressão da doença.

Os herpes vírus podem comprometer o controle imune contra periodontopatógenos devido uma variedade de mecanismos como diminuição na aderência, quimiotaxia, fagocitose e atividade bactericida de leucócitos polimorfonucleares (Ongrádi et al., 1984) e redução da resposta Th2 com diminuição da resposta mediada por anticorpos contra bactérias. Segundo Saygun et al. (2008) a infecção por herpes vírus pode aumentar a liberação de citocinas pró-inflamatórias que apresentam o potencial de ativar osteoclastos e metaloproteinases e diminuir mecanismos imunes contra bactérias, propiciando o crescimento de bactérias periodontopatogênicas.

Sugano et al. (2004) sugeriu que a interação entre *P. gingivalis* e EBV-1 é bidirecional onde o EBV-1 suprime a resposta do hospedeiro e permite o crescimento de *P. gingivalis* e este induz a reativação do EBV-1. O HCMV no periodonto pode aumentar o crescimento subgingival da *D. pneumosintes*, já a *D. pneumosintes* pode ativar o HCMV latente na infecção periodontal mostrando uma interação bidirecional entre o HCMV e a *D. pneumosintes* (Slots et al., 2002).

EBV-1, HCMV e coinfeção viral mostraram associação com a presença de patógenos periodontais e periodontite do adulto em um estudo de 140 indivíduos exibindo periodontite ou gengivite (Contreras et al., 1999).

Saygun et al. (2008) estudaram a associação entre EBV e HCMV e periodontopatógenos em 15 indivíduos com periodontite e 15 indivíduos saudáveis. EBV foi associado com *P. gingivalis* e *T. forsythia* e HCMV com *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *C. rectus* na periodontite.

Chalabi et al. (2008) estudaram amostras subgingivais de 40 indivíduos periodontalmente saudáveis e 40 indivíduos com periodontite crônica com PCS $\leq$ 3mm ou PCS $>$ 6mm. *P. gingivalis*, *T. forsythia*, EBV-1, HCMV e *A. actinomycetemcomitans* foram detectados em 95%, 75%, 72,5%, 50% e 12,5%

respectivamente nos sítios com PCS > 6mm. Associação foi encontrada entre *P. gingivalis*, *T. forsythia*, EBV-1, HCMV e periodontite crônica.

2.2 HIV e doença periodontal

A infecção pelo HIV resulta na perda de funções imunológicas, principalmente aquelas coordenadas por células T helper CD4+, e conseqüentemente, na diminuição da resposta imune, resultando no aumento de uma variedade de manifestação patológicas, incluindo as doenças periodontais (Lucht et al., 1991; Lamster et al., 1998).

Manifestações periodontais em pacientes HIV positivos foram inicialmente descritas por Winkler e Murray (1987) sendo três entidades da doença periodontal associadas ao HIV. Dentre elas, o eritema gengival linear (EGL), gengivite ulcerativa necrosante (GUN) e Periodontite ulcerativa necrosante (PUN). Essas doenças necrosantes foram inicialmente consideradas condições específicas dos indivíduos HIV positivos, porém, atualmente, elas não diferem daquelas encontradas em indivíduos imunocompetentes (Reichart et al., 2003). Segundo Corbet (2004) não existem critérios específicos para distinguir as doenças periodontais que ocorrem em pacientes HIV positivos daquelas em pacientes HIV negativos. Sabe-se que as lesões necrosantes são comumente observadas, mas, não limitadas a indivíduos com HIV. As doenças periodontais podem ser associadas ao HIV, não porque são diferentes, mas porque são mais comuns ou mais graves.

A prevalência de periodontite crônica em indivíduos HIV positivos variou de 5% a 69% (Holmstrup; Westergaard, 1994). Alguns estudos mostraram periodontite crônica mais severa em pacientes HIV positivos (Lucht et al., 1991; Yeung et al., 1993; Tomar et al., 1995; Mckaig et al., 2000), enquanto, outros falharam em mostrar essa característica (Cross; Smith, 1995; Martinez-Canut et al., 1996; Scheutz et al., 1997; Smith; Robinson, 2002). A questão de qual estágio da doença do HIV, expressado pela contagem de células CD4, pode afetar o curso e severidade da doença periodontal é ainda controverso. Porém, a maioria dos estudos que encontraram relação entre severidade da doença periodontal e o vírus

HIV foram em indivíduos com $CD4 < 200 \text{ mm}^3$ (Lucht et al., 1991; Yeung et al., 1993; Tomar et al., 1995; McKaig et al., 2000).

Com relação à microbiota na doença periodontal estudos têm confirmado a similaridade dos periodontopatógenos nos pacientes HIV positivos e negativos. Dentre as bactérias encontradas em indivíduos comprometidos sistemicamente as mais citadas são *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella intermedia* (Pi), *Fusobacterium nucleatum* (Fn), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Eikenella corrodens* e *Campylobacter rectus* (Murray et al., 1989; Zambon et al., 1990; Murray et al., 1991; Rams et al., 1991; Moore et al., 1993; Nakou et al., 1997; Tenenbaum et al., 1997; Teanpaisan et al., 2001). Entretanto, os trabalhos têm mostrado elevados níveis de microorganismos oportunistas associados aos tecidos periodontais de pacientes HIV+ (Nakou et al., 1997; Chattin et al., 1999). Tem sido estudado o papel dos vírus na etiologia da doença periodontal. O próprio vírus HIV parece promover importante papel local na destruição dos tecidos periodontais por suprimir células T Helper e/ou atuar como um super antígeno que desregula a resposta imune (Slots; Contreras, 2000).

2.3 HIV, herpes vírus e doença periodontal

O HIV é um retrovírus com afinidade especial pelo receptor da molécula CD4 que está situado na superfície de linfócitos T helper, e, que provoca diminuição no número dessas células. A infecção pelo HIV está associada com um aumento no risco de infecção por herpes vírus humano (HHVs) e suas doenças relacionadas (Miller et al., 2006). Em indivíduos HIV positivos a imunossupressão é conhecida por facilitar a reativação ou re-infecção dos herpes vírus (Fauci, 1993). Segundo Griffiths (1996), quando co-existem os dois tipos de vírus, o herpes e o HIV, o primeiro aumenta a expressão do genoma do HIV, que por sua vez, também reativa o herpes. O EBV, HCMV, HHV-6 e o HSV exacerbam a multiplicação do HIV por transativação. Aproximadamente 75% de todos os indivíduos HIV positivos, anteriormente ao uso da terapia antiretroviral (HAART), desenvolveram doenças associadas aos HHVS (Schwartz, 2004; Springer; Weinberg, 2004; Leidner; Aboulafia, 2005) como, Leucoplasia Oral Pilosa, Mononucleose Infecciosa e

Sarcoma de Kaposi. Porém, o advento da HAART tem diminuído a incidência dessas doenças (Leidner; Aboulafia, 2005).

Estudos recentes têm implicado os herpes vírus HSV-1, HCMV e EBV-1 na patogênese da doença periodontal (Contreras et al., 1999; Contreras; Slots, 2000; Chalabi et al., 2008; Imbronito et al., 2008; Nishiyama et al., 2008). Contreras et al. (2001) sugerem que as infecções pelos herpes vírus na periodontite associada ao HIV acentuam a supressão imune local, diminuem a imunidade protetora do periodonto, induzem a liberação de citocinas pró-inflamatórias, alteram a integridade estrutural do periodonto e levam a uma super proliferação de bactérias periodontopatogênicas. Contreras et al. (2001) sugerem ainda que a periodontite associada ao HIV é resultante de uma infecção mista, onde interagem o HIV, herpes vírus e as bactérias periodontopatogênicas.

A ativação do HIV pelo herpes vírus pode ser um importante fator no rápido colapso periodontal observado na periodontite relacionada ao HIV (Contreras et al., 2001). Em indivíduos HIV positivos a prevalência de herpes vírus parece ser maior comparados aos indivíduos HIV negativos (Mardirossian et al., 2000). A literatura apresenta poucos artigos relacionados aos herpes vírus na doença periodontal em indivíduos HIV positivos.

Mardirossian et al. (2000) determinaram a ocorrência dos herpes vírus 6,7 e 8 em biópsias de lesões periodontais e placa subgengival de 21 indivíduos soropositivos e 14 soronegativos para o HIV, todos portadores de periodontite, através de Nested PCR. Na periodontite associada ao HIV, 90% das biópsias e 62% da placas subgengivais apresentaram pelo menos 1 vírus. Nos indivíduos HIV negativos, 43% das biópsias apresentaram pelo menos 1 vírus. A ocorrência dos 3 vírus foi significativamente maior nos HIV positivos. Dupla ou tripla infecção herpética no periodonto ocorreu em 67% dos pacientes soropositivos para HIV. Os autores concluíram que o periodonto constitui um sítio de infecção ou de reserva para os três vírus.

Contreras et al. (2001) investigaram a presença dos herpes vírus 6, 7, 8, HSV-1, EBV-1, EBV-2 e HCMV em biópsias de lesões periodontais de 21 pacientes HIV positivos e 14 pacientes HIV negativos através do método de PCR. HCMV foi o vírus mais prevalente em indivíduos HIV positivos (81%), seguido de HHV-6 (71%) e HHV-7 (71%). Ocorrência de coinfecção por herpes vírus foi mais

comum em indivíduos HIV positivos (71%) em relação á indivíduos HIV negativos (7%).

Grande et al. (2008) estudaram a presença de EBV-1, HCMV e HSV-1 através da técnica de Nested PCR em saliva ,sangue periférico e placa subgengival de 50 indivíduos HIV positivos com doença periodontal (23 indivíduos com gengivite e 27 com periodontite crônica) e compararam com 50 indivíduos HIV negativos com periodontite crônica. HCMV foi o vírus mais prevalente nos pacientes HIV positivos (82%) e pacientes HIV negativos (84%), e a detecção nas três amostras foi semelhante. HSV-1 foi o vírus menos prevalente em ambos os grupos, sendo detectado em frequências semelhantes nas amostras orais e no sangue periférico. EBV-1 foi encontrado mais freqüentemente na saliva (62%) e placa subgengival (72%) de pacientes HIV positivos do que na saliva (40%) e placa subgengival (48%) nos pacientes HIV negativos.

Com relação à associação dos herpes vírus HSV-1, HCMV e EBV-1 e bactérias periodontais, não há estudos em doença periodontal de indivíduos HIV positivos.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi determinar a presença e a associação dos vírus HSV-1, HCMV, EBV-1 e bactérias periodontopatogênicas *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *T. forsythia* nas amostras de placa subgengival, saliva e sangue capilar de pacientes HIV positivos com doença periodontal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção de pacientes

Foram avaliados pacientes HIV positivos portadores de doença periodontal (gingivite e periodontite crônica), que estavam em tratamento no Centro de Atendimento a Pacientes Especiais (CAPE) na Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Neste estudo, os critérios para inclusão foram pacientes HIV positivos com periodontite crônica e gingivite e com idade superior a 30 anos. Um total de 50 indivíduos participaram do estudo sendo divididos em dois grupos. Foram 23 indivíduos HIV positivos com gingivite apresentando sangramento à sondagem em 4 ou mais sítios, PCS <3 mm e ausência de perda de inserção (Aas et al., 2007) e 27 indivíduos HIV positivos com periodontite crônica apresentando PCS $\geq$ 4 mm e NCI $\geq$ 4mm em 4 ou mais sítios (Aas et al., 2007). Os critérios de classificação para gingivite e periodontite foram de acordo com Armitage (1999).

Como critérios de exclusão foram considerados indivíduos portadores de diabetes melito, disfunção renal, doença coronária, contagem de CD4 <200 células por mm³, menos de 20 dentes na cavidade oral e submetidos a tratamento periodontal ou antibioticoterapia nos seis meses prévios ao estudo.

As informações geográficas, as doenças associadas aos pacientes HIV positivos, hábitos de tabagismo, carga viral, contagem de CD4 e medicamentos utilizados pelos indivíduos HIV positivos foram obtidas através dos prontuários do CAPE.

Os pacientes foram avaliados clinicamente por um único examinador e os seguintes parâmetros periodontais foram registrados com o auxílio de uma sonda periodontal¹: índice de sangramento à sondagem (ISS), profundidade clínica de sondagem (PCS) e nível clínico de inserção (NCI) em 6 sítios/dente (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual/palatino, lingual/palatino e disto-lingual/palatino).

¹ PCPUNC 15, HuFriedy, Chicago, IL, USA

4.2 Considerações éticas

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo sob o parecer nº 197/05, protocolo (Anexo A). Os participantes foram devidamente esclarecidos e informados sobre a pesquisa, seus métodos e objetivos, sendo incluídos somente após a obtenção de um consentimento livre e informado devidamente assinado. Os indivíduos foram orientados em relação a sua condição periodontal e esclarecidos sobre a importância do tratamento.

4.3 Coleta de Espécimes

4.3.1 Coleta de saliva

Foram coletadas amostras de saliva, não estimulada, em um coletor universal estéril, sendo posteriormente transferidas para tubos plásticos de 2 ml. As amostras foram conservadas a -70°C até a realização da extração do DNA. Para a coleta da saliva os pacientes foram instruídos a não comer ou escovar os dentes 30 minutos antes do exame.

4.3.2 Coleta de placa bacteriana subgengival

As amostras foram obtidas após a remoção de placa supragengival com curetas e isolamento relativo da área com rolete de algodão. Nos pacientes portadores de periodontite foram coletadas amostras do sítio mais profundo de cada quadrante, enquanto, nos pacientes com gengivite, de um sítio com sangramento à

sondagem de cada quadrante. Uma ponta de papel absorvente estéril² foi introduzida em cada sítio e mantida por 20 segundos (Slots; Reynolds, 1982). As pontas foram transferidas para um tubo de microcentrífuga³ e mantidas a -70°C.

4.3.3 Coleta de sangue capilar

Após assepsia da região com álcool, o sangue capilar foi obtido por punção da ponta dos dedos por lanceta, transferida em seguida para papel de filtro estéril⁴ sem anticoagulante. As amostras de papéis de filtro foram perfuradas com um perfurador de aço inoxidável⁵, produzindo discos de 3 mm de diâmetro. Os discos foram transferidos para um tubo de microcentrífuga e mantidos a -70°C.

4.4 Extração do DNA

4.4.1 Placa subgengival e sangue capilar

A extração do DNA das amostras de placa subgengival e sangue capilar foram de acordo com o método descrito por Parra e Slots (1996). Foram adicionados 0,5ml de água destilada aos cones de papel e papel de filtro e homogeneizados em um vórtex⁶. O DNA viral foi recuperado após a ligação deste a sílica em alta concentração de tiocianato de guanidina (GuSCN). Um volume de 0,25ml das amostras foi diluído em 0,25ml de água bi-destilada e homogeneizadas em vórtex. 0,4ml das amostras foram misturadas com 0,8ml de tampão de lise GuSCN (120g de tiocianato de guanidina, 100ml de 0,1mM de Tris-HCl⁷ pH 6,4,

² Tanari, SP, Brasil

³ AxygenScientific Inc., CA, USA

⁴ invitrogen

⁵ invitrogen

⁶ Vortex, Scientific Industries, NY, USA

⁷ Tris (hidroximetil) aminometanol. Invitroge Corporatin, Ca, USA

22ml de 0,2M EDTA, pH 8,0, 2,6g de Triton X-100) e 0,05ml de partículas de sílica⁸. Após homogeneização em vórtex, foram mantidas em temperatura ambiente por 10 minutos. O complexo DNA/sílica foi recuperado após centrifugação⁹ a 12000g 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 ressuspensionado em 100µl de tampão TE. As amostras foram incubadas a 56°C por 10 minutos e centrifugada a 12000g por 2 minutos. Os sobrenadantes foram armazenados à -70°C.

4.4.2 Digestão enzimática e Extração Saliva

Saliva na quantidade de 500µl foi transferida para um tubo eppendorff com capacidade de 2 ml. Este material foi centrifugado por 5 minutos a 1000rpm, o sobrenadante desprezado e o pellet lavado, duas vezes, com 1000µl de PBS 1X. O tubo foi centrifugado novamente por 5 minutos a 2000rpm e o sobrenadante desprezado. O pellet no fundo do tubo foi novamente lavado com 1000µl de PBS 1X, centrifugado e o sobrenadante novamente desprezado. O pellet no fundo do tubo foi submetido à digestão enzimática com proteinase K¹⁰. Foi adicionado ao corpo de fundo de 200 a 400µl de tampão de lise estéril NaCl¹¹1M; TRIS 1M, pH 8; EDTA¹²0,5M, pH 8; SDS 10%¹³ e proteinase K na concentração final de 500 µg/ml. Os tubos foram mantidos em banho maria a 55°C e sob agitação por três a sete dias até a completa dissolução do corpo de fundo. Foi adicionada solução de proteinase K (200 – 400 µg/ml) em intervalos de 24 horas e os tubos foram invertidos pelo menos uma vez ao dia. Após a completa dissolução do material, ou seja, quando a solução do tubo eppendorff ficou praticamente transparente, os tubos foram incubados a 95°C durante 10 minutos, para inativação da proteinase K.

⁸ Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA

⁹ Centrífuga IEC – Micromax

¹⁰ Proteinase K. Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA

¹¹ Cloreto de sódio. Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA

¹² Ácido etileno diamino tetracético. Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA

¹³ Sulfato de dodecil sódio. Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA

A saliva obtida de cada paciente foi submetida à extração de DNA, de acordo com Rivero et al. (2006). Foram adicionados 200µl de acetato de amônio¹⁴4M no tubo contendo o lisado para precipitação da proteína. O tubo foi homogeneizado por 20 segundos, incubado em gelo durante 5 minutos e centrifugado a 13000g por 3 minutos. A proteína precipitada foi observada como um corpo de fundo no tubo. O sobrenadante, contendo o DNA, foi transferido para outro tubo. Para a precipitação do DNA, foram adicionados 600µl de isopropanol 100%, homogeneizado e centrifugado a 16000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o corpo de fundo de DNA foi lavado com 600 µl de etanol 70% e centrifugado a 16000g por 2 minutos. Foi removido o álcool e após a evaporação do etanol 70% à temperatura ambiente, o corpo de fundo de DNA foi dissolvido em 30 a 50 µl de tampão TE (Tris-HCl 10mM, pH 7,4 e EDTA 1mM, pH 8) e mantido a 4 °C até a quantificação em espectrofotômetro.

4.5 Quantificação

Foi realizada quantificação de DNA em espectrofotômetro¹⁵ 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.

4.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para detecção bacteriana do *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *T. forsythia* foi empregado a técnica de PCR em estágio único. A técnica da PCR foi padronizada para cada par de iniciador, sendo otimizada entre outras condições,

¹⁴ Acetato de amônio.Synth, BR

¹⁵ Espectrofotômetro Beckman DU® 640,USA

diferentes concentrações de Cloreto de Magnésio¹⁶ ($MgCl_2$), de DNA e dos iniciadores senso e anti- senso que foram os descritos por Darlington et al. (1991), Espy e Smith (1995), Ashimoto et al. (1996), Garcia et al. (1998) e Tsurumi et al. (1987) (Tabela 4.1).

Todas as reações foram feitas em microtubos¹⁷ de 0,5 ml para PCR adicionando: tampão de PCR 1X¹⁸ (Tris-HCl 200mM, pH 8,4; KCl 500mM), dNTP 0,05mM (2'-deoxinucleotídeos 5'- triosfato, dATP, dTTP, dCTP, dGTP)¹⁹, $MgCl_2$, iniciadores senso e anti-senso²⁰, 1U Taq platinum DNA polimerase²¹ para amplificação do DNA viral ou 1U Taq DNA polimerase²² 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 termociclador²³. Para as reações de Nested-PCR foi utilizado na segunda amplificação 1 µl do produto da primeira.

As condições de ciclagem da PCR foram otimizadas 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, $MgCl_2$, dNTP 0,05mM (2'-deoxinucleotídeos 5'- triosfato, dATP, dTTP, dCTP, dGTP) e Taq platinum DNA polimerase. Para o segundo PCR, foram 35 ciclos de desnaturação 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.

Em todas as reações de PCR foi utilizado um controle positivo e negativo. O controle negativo foi constituído por todos os reagentes presentes na reação, porém isento de DNA. O controle positivo para EBV-1 foi originário de

¹⁶ Cloreto de Magnésio, Invitrogen Corporation, Brazil

¹⁷ Microtubo Axygen Scientific Inc., CA, USA

¹⁸ Tampão de PCR 1X, Invitrogen Corporation, Brazil

¹⁹ dNTP (2'- deoxinucleotídeos 5'- trifosfato, dATP, dTTP, dCTP, dGTP), Invitrogen Corporation, USA

²⁰ Iniciadores de senso e antisense, Invitrogen Corporation, Germany

²¹ Taq DNA polymerase platinum, Invitrogen Corporation, CA, USA

²² Taq DNA polimerase, Invitrogen Corporation, Brazil

²³ Termociclador, Mastercycler, Eppendorf, Germany

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 *A. actinomycetemcomitans* (ATCC 29522), *P. gingivalis* (ATCC 33277) e *T. forsythia* (ATCC 43037). Para Nested PCR, o controle negativo continha todos os reagentes presentes na reação isento de DNA, além do controle negativo da primeira PCR.

4.7 Amplificação do DNA

Os produtos da amplificação por PCR (10 µl) foram previamente avaliados em gel de agarose²⁴ a 2%, contendo brometo de etídio²⁵ à 0,2µg/ml. Utilizou-se uma cuba horizontal de eletroforese (70 V por 45 minutos), contendo tampão de corrida TAE²⁶ 1X, pH 8,1. Para a visualização e documentação do gel de amplificação do DNA foi utilizado um transluminador sob luz ultravioleta²⁷. O resultado das reações foi documentado utilizando-se o sistema AlphaDigiDoc® RT²⁸ e uma câmera fotográfica Polaroid DS4²⁹ com filme Polaroid modelo 667³⁰ e uma câmera digital Olympus³¹.

A todos os géis foi inserido um marcador de pares de base Low DNA mass Ladder³², o qual representa uma mistura equimolar de fragmentos de DNA de 2000pb a 100 pb.

4.8 Forma de Análise dos Resultados

²⁴ Agarose, Invitrogen Corporation, CA, USA

²⁵ Brometo de etídio, Invitrogen Corporation, CA, USA

²⁶ TAE Tris-Acetate EDTA buffer, Invitrogen Corporation, CA, USA

²⁷ Transluminador de luz ultravioleta, Fotodyne, Inc Hartland, WI, USA

²⁸ AlphaDigiDoc® RT (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA)

²⁹ Polaroid DS4, FISHER biotech, USA

³⁰ Polaroid tipo 667. Polaroid Inc., MA, USA

³¹ Câmera digital Olympus, Japan

³² Low DNA Mass Ladder, Invitrogen Corporation, Germany

As análises estatísticas foram realizadas com SPSS para Windows (versão 10.0). A média e o desvio-padrão foram calculados para a idade, sexo e número de dentes. Associações entre sexo, idade, grupo e hábito de fumar, bem como, entre dois vírus ou os diferentes métodos de amostragem foram verificadas com o teste do qui-quadrado ou teste Fisher. O teste t-Student foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos quanto à idade, número de dentes, perda de inserção, índice de sangramento e profundidade clínica de sondagem. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando o valor de $p < 0.05$.

Tabela 4.1 – Identificação dos iniciadores, temperatura de anelamento, comprimento do produto e referência

Agente infeccioso		TM (°C)	Produto (pb)	Referência
(BLAST)	INICIADORES			
HSV tipo I (X03101)	1° ciclo 5'-TACATCGGCGTCATCTACGGGG-3'	57	331	Tsurumi et al., 1987
	5'-GGGCCAGGCGCTTGTGGTGTA-3'			
	2° ciclo 5'-GCGTTTATCAACCGCACCTCC-3'	56	222	
	5'-CAGTTCGGCGGTGAGGACAAA-3'			
EBV tipo I (S71027)	1° ciclo 5'-AGGGATGCCTGGACACAAGA-3'	56	602	Espy; Smith 1995
	5'-TGTGCTGGTGCTGCTGGTGG-3'			
	2° ciclo 5'-AACTTCAACCCACACCATCA-3'	46	116	
	5'-TTCTGGACTATCTGGATCAT-3'			
HCMV (X17403)	1° ciclo 5'-GAGGACAACGAAATCCTGTTGGGCA-3'	56	150	Darlington et al., 1991
	5'-TCGACGGTGGAGATACTGCTGAGG-3'			
	2° ciclo 5'-ACCACCGCACTGAGGAATGTCAG-3'	50	100	
	5'-TCAATCATGCGTTTGAAGAGGTA-3'			
<i>A.a</i> (M75039)	5'-AAACCCATCTCTGAGTTCTTCTTC-3'	56	556	Ashimoto et al., 1996
	5'-ATGCCAACTTGACGTAAAT-3'			
<i>P. gingivalis</i> (AF414813.1)	5'-AGGCAGCTTGCCATACTGCG-3'	62	641	Ashimoto et al., 1996
	5'-ACTGTTAGCAACTACCGATGT-3'			
<i>T. forsythia</i> (AB208097.1)	5'-GCGTATGTAACCTGCCCGCA-3'	56	641	Ashimoto et al., 1996
	5'-TGCTTCAGTGTGAGTTATACCT-3'			

A.a: *A. actinomycetemcomitans*

Blast = Basic Local Alignment Search Tool (National Institutes of Health Bethesda Maryland).

5 RESULTADOS

5.1 Condições demográficas, clínicas e imunológicas As condições demográficas, clínicas e imunológicas dos 50 indivíduos avaliados neste estudo estão resumidas na tabela 5.1. O grupo HIV-p consistiu de 27 pacientes HIV positivos com periodontite crônica, enquanto o grupo HIV-g, de 23 pacientes HIV positivos com gengivite. Os grupos foram homogêneos quanto à idade, sexo, número de dentes e tabagismo. Indivíduos com periodontite apresentaram perda de inserção significativamente maior em relação aos indivíduos com gengivite ($p < 0.0001$) (Tabela 5.1).

Com relação às comorbidades, 40 pacientes apresentaram pelo menos um patologia associada. A hepatite foi a doença mais frequentemente observada, seguida pela candidíase vaginal, anemia, herpes zoster, herpes anogenital e sífilis. Todos os 50 pacientes faziam uso de medicação (HAART). Lamivudina foi a droga mais utilizada (64%), seguida de zidovudina (44%). Noventa e quatro por cento dos pacientes utilizavam combinações de dois ou mais medicamentos.

Tabela 5.1. Descrição dos dados demográficos, clínicos e imunológicos dos pacientes HIV positivos com periodontite e gengivite

Paramêtros clínicos	Gengivite -HIV	Periodontite- HIV	valor p
Número de pacientes	23	27	
Idade (média $\pm$ DP; anos)	41.65 $\pm$ 8.36	41.22 $\pm$ 7.13	0.7
% feminino	30%	26%	0.72
Número de fumantes	7	8	0.67
Número de dentes (média $\pm$ DP)	24.13 $\pm$ 3.63	22.17 $\pm$ 4.22	0.13
NCI (média $\pm$ DP)	2.25 $\pm$ 0.65	3.21 $\pm$ 0.85	$<0.0001\alpha$
PCS (média $\pm$ DP)	1.88 $\pm$ 0.29	2.64 $\pm$ 1.02	0.001 β
SS (média $\pm$ DP)	48.6 $\pm$ 28.7	57.7 $\pm$ 26.5	0.29
Pacientes com T CD4 $<$ 500cell/mm ³	13	19	0.3
Pacientes com carga viral detectada	10	13	0.74

α Associação significativa, $p < 0,0001$, Teste T Student

β Associação significativa, $p = 0,001$, Teste Mann Whitney

5.2 Dados microbiológicos

A tabela 5.2 mostra a associação entre os microorganismos e a origem das amostras. Com relação aos vírus, no grupo HIV-p, EBV-1 e *T. forsythia* apresentaram maior prevalência nas amostras de placa subgengival (70.4% e 51.8%, respectivamente) e saliva (81.5%, 40.7%, respectivamente) do que no sangue capilar (22% e 0, respectivamente) ($p<0.005$ e $p<0.0001$, respectivamente). A bactéria *P. gingivalis* foi mais freqüente na placa subgengival (77.7%) em relação à saliva (25.9%) e sangue capilar (25.9%) ($p<0.0001$). No grupo HIV-g, *P. gingivalis* e HCMV apresentaram maior freqüência na placa subgengival (95.6% e 91.3%, respectivamente) do que na saliva (21.8% e 65.2, respectivamente) e sangue capilar (17.4% e 60.86%, respectivamente) ($p<0.0001$ e $p=0.004$, respectivamente). *T.forsythia* e EBV-1 foram detectados com maior freqüência na placa subgengival (47.8%, 78.3%, respectivamente) e saliva (52.2%, 52.2%, respectivamente) do que no sangue (8.7% e 13%, respectivamente) ($p=0.004$ e $p<0.005$, respectivamente). *A.actinomycescomitans* e HSV-1 foram detectados com freqüências similares nas três amostras nos dois grupos (Tabelas 5.2 e 5.3).

Tabela 5.2 - Freqüência de EBV-1, HCMV, HSV-1 e periodontopatógenos nas amostras de saliva, sangue e placa subgengival no grupo HIV-g

Bactérias/Vírus	Grupo HIV-g (%)		
	Origem da amostra		
	Placa subgengival	sangue	saliva
<i>A.a</i>	5 (21.7%)	1 (4.3%) p=0.15	0
<i>P.gingivalis</i>	22 (95.6%) ^B	4 (17.4%) ^A p<0.0001	5 (21.8%) ^A
<i>T. forsythia</i>	11 (47.8%) ^A	2 (8.7%) ^B p=0.004	12 (52.2%) ^A
HCMV	21 (91.30%) ^B	14 (60.86%) ^A p=0.004	15 (65.21%) ^A
HSV	2 (8.7%)	3 (13.0%) p=0.67	4 (17.4%)
EBV-1	18 (78.3%) ^A	3 (13%) ^B p<0.005	12 (52.2%) ^A

Teste Qui quadrado

p< 0.05 significa diferença significativa entre as amostras com relação a presença de vírus e bactérias. Letras diferentes significam entre quais amostras está a diferença.

Tabela 5.3 - Frequência de EBV-1, HCMV, HSV-1 e periodontopatógenos nas amostras de saliva, sangue e placa subgengival no grupo HIV-p

Bactérias/ Vírus	Grupo HIV-p (%)		
	Origem da amostra		
	placa subgengival	sangue	saliva
<i>A.a</i>	4 (14.8%)	2 (7.4%) p=0.33	1 (3.7%)
<i>P.gingivalis</i>	21 (77.7%) ^B	7 (25.9%) ^A p<0.0001	7 (25.9%) ^A
<i>T. forsythia</i>	14 (51.8%) ^A	0 ^B p<0.0001	11 (40.7%) ^A
HCMV	20 (74.1%)	20 (74.1%) p=0.93	21 (77.7%)
HSV	1 (3.7%)	0 p=0.06	4 (14.8%)
EBV-1	19 (70.4%) ^A	6 (22%) ^B p<0.005	22 (81.5%) ^A

Teste Qui Quadrado

p < 0.05 significa diferença significativa entre as amostras com relação a presença de vírus e bactérias.

Letras diferentes significam entre quais amostras está a diferença.

Todas as bactérias foram detectadas com prevalência semelhante em ambos os grupos (HIV-p e HIV-g) (Figura 5.1). Não houve associação significativa entre a doença periodontal e presença de *A.actinomycescomitans*, *P. gingivalis* e *T. forsythia* nas amostras de placa subgengival, sangue ou saliva (p>0.05).

Aa: *A. actinomycetemcomitans*; Pg: *P. gingivalis*; Tf: *T. forsythia*

Figura 5.1 - Distribuição dos pacientes de acordo com a doença periodontal e a presença de bactérias nas amostras de placa subgingival, sangue e saliva

Não houve associação entre o tipo de doença periodontal e a presença de HCMV e HSV-1 na placa subgingival, sangue e saliva (Figura 5.2). Associação significativa foi detectada para EBV-1 e periodontite na saliva ($p = 0.027$, teste qui-quadrado).

HCMV: citomegalovírus humano; EBV: Epstein-Barr; HSV1: Herpes simples-1

Figura 5.2 - Distribuição dos pacientes de acordo com a doença periodontal e a presença de herpes vírus nas amostras de placa subgingival, sangue e saliva

* Associação significativa. $P=0.027$, Teste Qui-quadrado.

Com relação a coinfeção viral, o paciente foi considerado positivo para o vírus se pelo menos uma amostra i.e (placa subgengival, saliva e sangue capilar) foi positiva para qualquer dos três herpes vírus. A coinfeção viral nos grupos HIV-p e HIV-g é apresentada na tabela 5.4.

Não houve associação entre doença periodontal e a presença de diferentes vírus na placa subgengival e sangue. No entanto, foi encontrada associação entre doença periodontal e presença de diferentes vírus na saliva. Pacientes com periodontite apresentaram dois vírus na saliva em 73,1% dos casos ($p = 0.028$, teste Fisher).

Tabela 5.4 - Distribuição dos pacientes de acordo com a doença periodontal e a presença de diferentes vírus nas amostras de saliva, placa subgengival e sangue

Condição Periodontal			
Diferentes vírus	Gengivite	Periodontite	p
Placa subgengival			
Ausente	-	01 (100.0%)	(Fisher) [#]
1	06 (31.6%)	13 (68.4%)	0.183
2	16 (57.1%)	12 (42.9%)	
3	01 (50.0%)	01 (50.0%)	
Sangue			
Ausente	08 (61.5%)	05 (38.5%)	(Fisher) [±]
1	10 (37.0%)	17 (63.0%)	0.357
2	05 (50.0%)	05 (50.0%)	
Saliva			
Ausente	04 (80.0%)	01 (20.0%)	(Fisher) [#]
1	09 (60.0%)	06 (40.0%)	0.028*
2	07 (26.9%)	19 (73.1%)	
3	03 (75.0%)	01 (25.0%)	
Total	23	27	50

* Associação significativa ($\alpha = 5\%$);

Freeman-Halton extensão do teste de probabilidade exato de Fisher para duas linhas por quatro colunas da tabela de contingência

± Freeman-Halton extensão do teste de probabilidade exato de Fisher para duas linhas por três colunas da tabela de contingência

A prevalência dos vírus HSV-1, EBV-1, HCMV e das bactérias na saliva, placa subgengival e sangue de acordo com a contagem de células CD4 dos pacientes HIV-positivos é apresentada nas tabelas 5.5 e 5.6. Não houve associação entre a contagem de CD4 e a presença de *A.actinomycescomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, EBV-1 e HSV-1 nas amostras estudadas. No entanto, houve associação entre contagem de CD4 e presença de HCMV na saliva ($p=0.008$, teste qui-quadrado).

Tabela 5.5 – Distribuição dos pacientes de acordo com CD4 e presença de vírus na saliva, placa subgengival e sangue

		HCMV						Total
		Placa subgengival		Sangue		Saliva		
		Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	
CD4 cell/mm ³	<500	27 (84.3%)	05 (15.6%)	23 (71.8%)	09 (28.1%)	19 (59.3%)	13 (40.6%)	32
	≥500	14 (77.7%)	04 (22.2%)	11 (61.1%)	07 (38.8%)	17 (94.4%)	01 (05.5%)	18
	P	(χ ²) 0.56		(χ ²) 0.434		(χ ²) 0.008*		50
EBV								
		Placa subgengival		Sangue		Saliva		Total
		Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	
CD4 cell/mm ³	<500	26 (81.2%)	06 (18.7%)	06 (18.7%)	26 (81.2%)	19 (59.3%)	13 (40.6%)	32
	≥500	11 (61.1%)	07 (38.8%)	03 (16.6%)	15 (83.3%)	15 (83.3%)	03 (16.6%)	18
	P	(χ ²) 0.119		(χ ²) 0.854		(χ ²) 0.081		50
HSV1								
		Placa subgengival		Sangue		Saliva		Total
		Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	
CD4 cell/mm ³	<500	02 (06.2%)	30 (93.7%)	02 (06.2%)	30 (93.7%)	05 (15.6%)	27 (84.3%)	32
	≥500	01 (05.5%)	17 (94.4%)	01 (05.5%)	17 (94.4%)	04 (22.2%)	14 (77.7%)	18
	P	(Fisher) 1		(Fisher) 1		(χ ²) 0.56		50

* Associação significativa ($\alpha = 5\%$)

Tabela 5.6 – Distribuição dos pacientes de acordo com CD4 e presença de bactérias na saliva, placa subgengival e sangue

A.a								
		Placa subgengival		Sangue		Saliva		Total
		Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	
CD4 cell/mm ³	<500	07 (21.8%)	25 (78.1%)	03 (09.3%)	29 (90.6%)	01 (03.1%)	31 (96.8%)	32
	≥500	02 (11.1%)	16 (88.8%)	-	18 (100%)	-	18 (100%)	18
	P	(χ ²) 0.342		(Fisher) 0.544		(Fisher) 1		50
P.g								
		Placa subgengival		Sangue		Saliva		Total
		Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	
CD4 cell/mm ³	<500	27 (84.3%)	05 (15.6%)	08 (25.0%)	24 (75.0%)	07 (21.8%)	25 (78.1%)	32
	≥500	16 (88.8%)	02 (11.1%)	03 (16.6%)	15 (83.3%)	05 (27.7%)	13 (72.2%)	18
	P	(Fisher) 1		(χ ²) 0.495		(χ ²) 0.639		50
T.f								
		Placa subgengival		Sangue		Saliva		Total
		Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	
CD4 cell/mm ³	<500	14 (43.7%)	18 (56.2%)	01 (03.1%)	31 (96.8%)	12 (37.5%)	20 (62.2%)	32
	≥500	11 (61.1%)	07 (38.8%)	01 (05.5%)	17 (94.4%)	11 (61.1%)	07 (38.8%)	18
	P	(χ ²) 0.239		(Fisher) 1		(χ ²) 0.108		50

A.a: *A. actinomycetemcomitans*P.g: *P. gingivalis*T.f: *T. forsythia*

O número de coinfeções virais e bacterianas está apresentado na tabela 5.7. No grupo HIV-p, 15 pacientes mostraram mais de dois vírus, enquanto no grupo HIV-g, 9 pacientes apresentaram dois vírus. O vírus não foi detectado em seis pacientes no grupo HIV-p e cinco pacientes do grupo HIV-g. O grupo HIV-p apresentou 14 pacientes com mais de duas bactérias, enquanto o grupo HIV-g apresentou 13 pacientes com mais de 2 bactérias.

Tabela 5.7 – Frequência de coinfeção de herpes vírus e bactérias na placa subgengival dos grupos periodontite e gengivite

	Coinfeção viral (n)				Coinfeção bacteriana (n)			
	0	1	2	3	0	1	2	3
HIV-p	6	9	13	2	3	10	13	1
HIV-g	5	16	9	0	1	9	10	3

A coinfeção entre os pares de microrganismos estão apresentados nas tabelas 5.8, 5.9 e 5.10. A frequência de associação entre EBV-1/HCMV foi significativamente maior no grupo HIV-p (63%) do que no grupo HIV-g na saliva (34,8%) (Tabela 5.10, $p=0.047$, teste qui-quadrado).

Tabela 5.8 – Frequência de associação entre vírus e bactérias com relação à doença periodontal nas amostras de placa subgengival

	grupo HIV-g	grupo HIV-p	P
	N=23	N=27	
EBV-1+ HCMV	16 (69.6%)	13 (48.1%)	$p = 0.126^{\dagger}$
EBV-1+ HSV-1	01 (4.3%)	01 (3.7%)	$p = 1.000^{\ddagger}$
HSV-1+ HCMV	02 (8.7%)	1 (3.7%)	$p = 0.588^{\ddagger}$
EBV-1+ <i>T.forsythia</i>	08 (34.8%)	10 (37.0%)	$p = 0.869^{\dagger}$
EBV-1+ <i>A.actinomyetemcomitans</i>	03 (13%)	04 (14.8%)	$p = 1.000^{\ddagger}$
EBV-1+ <i>P.gingivalis</i>	17 (73.9%)	16 (59.3%)	$p = 0.276^{\dagger}$
HCMV+ <i>T.forsythia</i>	11 (47.8%)	08 (29.6%)	$p = 0.186^{\dagger}$
HCMV+ <i>A.actinomyetemcomitans</i>	05 (21.7%)	03 (11.1%)	$p = 0.444^{\ddagger}$
HCMV+ <i>P.gingivalis</i>	21 (91.3%)	19 (70.4%)	$p = 0.065^{\dagger}$
HSV-1 + <i>A.actinomyetemcomitans</i>	0	0	-
HSV-1 + <i>P.gingivalis</i>	02 (8.7%)	1 (3.7%)	$p = 0.588^{\ddagger}$
HSV-1 + <i>T.forsythia</i>	0	0	-
<i>A.actinomyetemcomitans</i> + <i>P.gingivalis</i>	05 (21.7%)	03 (11.1%)	$p = 0.444^{\ddagger}$
<i>A.actinomyetemcomitans</i> + <i>T.forsythia</i>	03 (13.0%)	02 (7.4%)	$p = 0.651^{\dagger}$
<i>P.gingivalis</i> + <i>T.forsythia</i>	11 (47.8%)	11 (40.7%)	$p = 0.615^{\dagger}$

† - teste Qui-quadrado

‡ - teste Fisher

Tabela 5.9 - Frequência de associação entre vírus e bactérias com relação à doença periodontal nas amostras de sangue

	grupo HIV-g	grupo HIV-p	P
	N=23	N=27	
EBV-1+ HCMV	02 (8.7%)	05 (18.5%)	p = 0.430 [†]
EBV-1+ HSV-1	0	0	-
HSV-1+ HCMV	03 (13.0%)	0	p = 0.090 [†]
EBV-1+ <i>T.forsythia</i>	02 (8.7%)	0	p = 0.207 [†]
EBV-1+ <i>A.actinomyetemcomitans</i>	0	01 (3.7%)	p = 1.000 [‡]
EBV-1+ <i>P.gingivalis</i>	01 (4.3%)	01 (3.7%)	p = 1.000 [†]
HCMV+ <i>T.forsythia</i>	02 (8.7%)	0	p = 0.207 [†]
HCMV+ <i>A.actinomyetemcomitans</i>	01 (4.3%)	02 (7.4%)	p = 1.000 [‡]
HCMV+ <i>P.gingivalis</i>	04 (17.4%)	07 (25.9%)	p = 0.468 [†]
HSV-1 + <i>A.actinomyetemcomitans</i>	01 (4.3%)	0	p = 0.460 [†]
HSV-1 + <i>P.gingivalis</i>	0	0	-
HSV-1 + <i>T.forsythia</i>	0	0	-
<i>A.actinomyetemcomitans</i> + <i>P.gingivalis</i>	0	0	-
<i>A.actinomyetemcomitans</i> + <i>T.forsythia</i>	0	0	-
<i>P.gingivalis</i> + <i>T.forsythia</i>	01 (4.3%)	0	p = 0.460 [†]

† teste Qui-quadrado

‡ teste Fisher

Tabela 5.10 - Frequência de associação entre vírus e bactérias com relação à doença periodontal nas amostras de saliva

	grupo HIV-g	grupo HIV-p	P
	N=23	N=27	
EBV-1+ HCMV	08 (34.8%)	17 (63.0%)	p = 0.047* [†]
EBV-1+ HSV-1	03 (13.0%)	02 (7.4%)	p = 0.651 [‡]
HSV-1+ HCMV	04 (17.4%)	03 (11.1%)	p = 0.689 [‡]
EBV-1+ <i>T.forsythia</i>	07 (30.4%)	11 (40.7%)	p = 0.449 [†]
EBV-1+ <i>A.actinomytemcomitans</i>	0	01 (3.7%)	p = 1.000 [‡]
EBV-1+ <i>P.gingivalis</i>	02 (9.1%)	05 (18.5%)	p = 0.436 [‡]
HCMV+ <i>T.forsythia</i>	07 (30.4%)	09 (33.3%)	p = 0.827 [†]
HCMV+ <i>A.actinomytemcomitans</i>	0	01 (3.7%)	p = 1.000 [‡]
HCMV+ <i>P.gingivalis</i>	03 (13.0%)	07 (25.9%)	p = 0.256 [†]
HSV-1 + <i>A.actinomytemcomitans</i>	0	0	-
HSV-1 + <i>P.gingivalis</i>	03 (13.0%)	1 (3.7%)	p = 0.322 [‡]
HSV-1 + <i>T.forsythia</i>	04 (17.4%)	1 (3.7%)	p = 0.167 [‡]
<i>A.actinomytemcomitans</i>+ <i>P.gingivalis</i>	0	01 (3.7%)	p = 1.000 [‡]
<i>A.actinomytemcomitans</i>+ <i>T.forsythia</i>	0	0	-
<i>P.gingivalis</i> + <i>T.forsythia</i>	03 (13%)	04 (14.8%)	p = 1.000 [‡]

* Associação significativa ($\alpha = 5\%$)[†] teste Qui-quadrado[‡] teste Fisher

6 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi verificar uma possível relação entre os herpes vírus e bactérias periodontopatogênicas em pacientes HIV+ com doença periodontal. Os resultados mostraram que a prevalência das bactérias *A.actinomycescomitans*, *P. gingivalis*, *T.forsythia* e dos vírus HCMV e HSV-1 foram semelhantes entre os grupos periodontite e gengivite. A coinfeção bacteriana, a coinfeção herpes vírus- bactéria e a coinfeção viral, exceto EBV-1/HCMV, também foram semelhantes entre os grupos.

Estudos em indivíduos HIV negativos mostraram associação entre HSV1-*T.forsythia*-*T.denticola* (Nishiyama et al., 2008), EBV e HCMV com periodontopatógenos (*P. gingivalis*, *P.nigrescens*, *P.intermedia*, *T.forsythia* e *A.actinomycescomitans*), sendo encontrados com maior frequência na periodontite crônica do que em indivíduos periodontalmente saudáveis (Contreras et al., 1999; Slots et al., 2002; Imbronito et al., 2008; Saygun et al., 2008) ou com gengivite (Contreras et al., 1999; Watanabe et al., 2007; Imbronito et al., 2008). Baseado na literatura estudada, não há estudos sobre a associação entre herpes vírus e periodontopatógenos em pacientes HIV+ com doença periodontal.

A semelhança na prevalência e associação dos herpes vírus e bactérias nos pacientes HIV positivos com gengivite e periodontite, assim como as coinfeções bacterianas, virais, exceto EBV-1/HCMV, sugere que indivíduos HIV-positivos com gengivite podem estar em maior risco de destruição periodontal. Murray et al. (1989), Murray et al. (1991) e Moore et al. (1993), sugeriram a gengivite associada ao HIV como uma fase precoce ou precursora da periodontite associada ao HIV. Moore et al. (1993) relataram que os patógenos usuais encontrados na periodontite e gengivite associadas ao HIV incluem *A. actinomycescomitans*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *P. gingivalis* e espiroquetas. A maioria dos estudos mostrou similaridade entre a microbiota bacteriana da periodontite e gengivite em indivíduos HIV-positivos e negativos com periodontite (Zambon et al., 1990; Murray et al., 1991; Rams et al., 1991; Moore et al., 1993; Brady et al., 1996; Nakou et al., 1997; Chattin et al., 1999; Scully et al., 1999; Teanpaisan et al., 2001; Tsang; Samaranayake, 2001). No entanto, poucos são os

estudos que comparam a microbiota nas diferentes formas da doença periodontal nos indivíduos HIV positivos. Estudos sobre a doença periodontal em pacientes HIV positivos incluem formas atípicas da doença, como doenças necrosantes e gengivite ou periodontite associadas à infecção pelo HIV, com características diferentes daquelas encontradas na periodontite crônica (Greenspan; Greenspan, 1990). Além disso, a maioria dos estudos comparam a doença periodontal entre pacientes HIV positivos e negativos. A variabilidade dos estudos com relação ao diagnóstico da doença periodontal nos pacientes HIV positivos e a metodologia utilizada torna difícil comparar nossos resultados em pacientes com periodontite crônica e gengivite.

Com relação aos herpes vírus, pacientes HIV positivos parecem mostrar um número maior desses vírus na bolsa periodontal do que em pacientes HIV negativos (Mardirossian et al., 2000; Contreras et al., 2001; Grande et al., 2008).

No presente estudo apenas EBV-1 (81,5%), coinfeção por EBV-1/HCMV (63%) e a presença de dois tipos diferentes de herpes vírus (73,1%) foram maiores na periodontite do que na gengivite de pacientes HIV positivos em amostras de saliva. A associação EBV-1/HCMV observada no presente estudo confirma os estudos anteriores que mostraram essa associação em placa subgengival de pacientes HIV negativos (Contreras; Slots, 1996; Parra; Slots, 1996; Contreras et al., 1999). É importante ressaltar que a coinfeção pelo HCMV e EBV-1 parece estar relacionada com uma progressão mais rápida da periodontite quando comparada a monoinfecção viral na doença periodontal (Slots et al., 2002; Slots et al., 2003; Chalabi et al., 2008). Wu et al. (2007) e Chalabi et al. (2008) mostraram associação entre periodontite crônica e infecção por EBV-1/HCMV.

Uma infecção ativa por HCMV pode reativar EBV latente e a coinfeção por EBV/HCMV pode aumentar a virulência da infecção pelos herpes vírus. Segundo Syrjänen et al. (1999) a coinfeção pelo EBV/HCMV em pacientes com HIV também aumentou a potencial de reativação do herpes vírus. Além disso, os herpes vírus podem interagir com o vírus HIV aumentando a multiplicação do HIV por transativação e acelerando a destruição do tecido periodontal (Ho et al., 1990; Lusso et al., 1991; Griffiths, 1996; Miller, 1996).

Apenas Contreras et al. (2001) e Grande et al. (2008) estudaram EBV-1, HCMV e HSV-1 em indivíduos HIV+ com doença periodontal. EBV-1, HCMV e HSV-1 foram detectados através de PCR em 57%, 81% e 43% respectivamente, em

biópsias gengivais de indivíduos HIV+ (Contreras et al., 2001). HCMV foi detectado em 82%, 72% e 68% na placa subgengival, saliva e sangue capilar, respectivamente em pacientes HIV+ com doença periodontal e EBV-1 foi detectado em 72%, 62% e 18% na placa subgengival, saliva e sangue capilar, respectivamente nos mesmos pacientes (Grande et al., 2008).

Outros estudos detectaram EBV-1 na saliva de indivíduos HIV+ com frequências variando entre 70% a 90%, similarmente à detectada no presente estudo (81,5%). No entanto, esses trabalhos não estudaram doença periodontal especificamente (Ling et al., 2003; Miller et al., 2006; Griffin et al., 2008).

Os estudos de Idesawa et al. (2004) e Saygun et al. (2005) em indivíduos HIV negativos relataram que os níveis salivares de EBV diminuíram em resposta ao tratamento periodontal, e, que parece haver uma associação entre EBV e doença periodontal, como observado nesse estudo.

Sítios de replicação viral, tais como, tecidos das tonsilas palatina e lingual na cavidade oral, inflamação dos tecidos periodontais e doenças sistêmicas podem contribuir para a maior presença do EBV na saliva (Miller et al., 2006). Além disso, sítios de latência e replicação do HCMV, tais como, as glândulas salivares, e, o fato de que a reativação do HCMV pode ocorrer mais precocemente nestas glândulas do que no sangue (Fidouh-Houhou et al., 2001) estão de acordo com nossos resultados que apresentaram maior frequência de herpes vírus e bactérias na placa subgengival e saliva do que no sangue capilar.

Devido ao fato de a contagem de células CD4 dos pacientes HIV-positivos poder influenciar a microbiota subgengival e o padrão de destruição da doença periodontal, este estudo avaliou a contagem de células CD4 em relação à doença periodontal e à frequência dos herpes vírus e bactérias. A contagem de células CD4 não influenciou a severidade da doença periodontal assim como em outros estudos (Martinez-Canut et al., 1996; Scheutz et al., 1997; Smith; Robinson, 2002; Alves et al., 2006; Brito et al., 2008) ou a prevalência de patógenos periodontais como em estudos anteriores (Tenenbaum et al., 1997; Smith; Robinson, 2002). Apenas o HCMV apresentou maior frequência na saliva de pacientes com $CD4 \geq 500$ células/mm³. Estudos anteriores mostraram maior prevalência de HCMV em pacientes HIV+ com quadro de imunossupressão mais severo (Lucht et al., 1991; Gérard et al., 1997; Fidouh-Houhou et al., 2001), enquanto outros não detectaram

essa associação (Gautheret et al., 1997; Griffin et al., 2008). É importante dizer que o estudo não incluiu indivíduos altamente imunossuprimidos, com $CD4 \leq 200$ células/mm³, o que pode ter influenciado este resultado.

Os pacientes do presente estudo estavam sob terapia HAART. Com base em nossos resultados, parece que a terapia antiretroviral teve pouco efeito sobre os herpes vírus na placa subgengival e saliva, uma vez que os vírus HSV-1, HCMV e EBV-1 foram freqüentemente detectados nos pacientes infectados pelo HIV com gengivite e periodontite. Dehee et al. (2001) e Stevens et al. (2002) que estudaram a prevalência do EBV no sangue de indivíduos portadores do HIV também observaram que a HAART não influenciou a presença de EBV.

Em resumo, a prevalência dos herpes vírus, bactérias e suas interações mostraram semelhança nos casos de gengivite e periodontite em indivíduos HIV+. Em exceção, EBV-1, coinfeção viral por EBV-1/HCMV, e a coinfeção por dois tipos diferentes de vírus (73,1%) foram associados à periodontite nas amostras de saliva. Esses resultados podem ter implicações potencialmente importantes, pois nos pacientes HIV+ a gengivite pode apresentar um risco maior para a destruição periodontal. Além disso, herpes vírus têm sido associados com outras doenças encontradas em indivíduos HIV+, como o sarcoma de Kaposi, linfoma não-Hodgkin e leucoplasia pilosa oral, o que torna muito importante a redução de herpes vírus salivares por tratamento periodontal adequado (Idesawa et al., 2004; Saygun et al., 2005) e conseqüentemente a diminuição da transmissão horizontal de herpes vírus. Essa redução seria também benéfica para diminuir a interação herpes vírus/HIV não favorecendo a expressão do HIV, bem como reduzir o efeito lítico direto do HIV nos tecidos periodontais (Gonçalves, 2005).

Mais estudos são necessários para esclarecer a associação entre herpes vírus e periodontopatógenos na progressão da doença periodontal em pacientes HIV+.

7 CONCLUSÃO

Não houve associação, em pacientes HIV+, entre coinfeção de herpes vírus e patógenos periodontais e doença periodontal. Na saliva de pacientes HIV+, houve associação entre EBV-1 e coinfeção por EBV-1 + HCMV com a doença periodontal.

REFERÊNCIAS¹

- Aas JA, Barbutto SM, Alpagot T, Olsen I, Dewhirst FE, Paster BJ. Subgingival plaque microbiota in HIV positive patients. *J Clin Periodontol*. 2007;34:189-195.
- Abramson JS, Mills EL. Depression of neutrophil function induced by viruses and its role in secondary microbial infections. *Rev Infect Dis*. 1988;10:326–41.
- Alves M, Mulligan R, Passaro D, Gawell S, Navazesh M, Phelan J, Greenspan D, Greenspan JS. Longitudinal Evaluation of Loss of Attachment in HIV-Infected Women Compared to HIV-Uninfected Women. *J Periodontol*. 2006;77:773-9.
- Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999;4:1-6.
- 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.
- Bakaletz LO. Viral potentiation of bacterial superinfection of the respiratory tract. *Trends Microbiol*. 1995;3:110-4.
- Baqui AA, Jabra-Rizk MA, Kelley JI, Zhang M, Falkler WA, Meiller TF. Enhanced interleukin-1beta, interleukin- and tumor necrosis factor-alpha production by LPS stimulated human monocytes isolated from HIV+ patients. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2000;22:401–21.
- Brady LJ, Walker C, Oxford GE, Stewart C, Magnusson I, McArthur W. Oral diseases, mycology and periodontal microbiology of HIV-1 infected women. *Oral Microbiol Immunol*. 1996;11:371-80.
- Brito A, Escalona LA, Correnti M, Perrone M, Bravo IM, Tovar V. Periodontal conditions and distribution of *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in HIV-infected patients undergoing anti-retroviral therapy and in an HIV-seronegative grupo of the Venezuelan population. *Acta Odontologica Latinoamericana*. 2008;21:89-96.
- Chalabi M, Moghim S, Mogharehabed A, Najafi F, Rezaie, F. EBV and CMV in chronic Periodontite: a prevalence study. *Arch Virol*. 2008;153:1917-9.

1 De acordo com Estilo Vancouver

Chattin BR, Ishirara K, Okuda K, Hirai Y, Ishikawa T. Specific microbial colonizations in the periodontal sites of HIV infected subjects. *Oral Microbiol Immunol*. 1999;43:847-52.

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

Contreras A, Slots J. Herpesviruses in human periodontal disease. *J Periodontal Res*. 2000;35:3–16.

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

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

Corbet. Diagnosis of acute periodontal lesions. *Periodontol 2000*. 2004;34:204-16.

Croft NP, Shannon-Lowe C, Bell AI, Horst D, Kremmer E, Rensing ME, Wiertz EJHJ, Middeldorp JM, Rowe M, Rickinson AB, Andrew D, Hislop AD. Stage-Specific Inhibition of MHC Class I Presentation by the Epstein-Barr Virus BNLF2a Protein during Virus Lytic Cycle. *PLoS Pathog*. 2009;5:e1000490.

Cross DL, Smith GLF. Comparison of periodontal disease in HIV seropositive subjects and controls (II). *Microbiology, immunology and predictors of disease progression*. *J Clin Periodontol*. 1995;22 569-77.

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*. 1985;72:1985-9.

Dehee A, Asselot C, Piolot T, Jacomet C. Quantification of Epstein-Barr virus DNA load in peripheral sangue of human immunodeficiency virus-infected patients using real-time PCR. *J Med Virol*. 2001;65:543-52.

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.

Fauci As. Immunopathogenesis of HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1993;6:655-62.

Fidouh-Houhou N, Duval X, Bissuel F, Bourbonneux V, Flandre P, Ecobichon JL, Jordan MC, Vildé JL, Vézinet FB, Leport C. Salivary cytomegalovirus (CMV) shedding, glycoprotein B genotype distribution and CMV disease in Human Immunodeficiency Virus-seropositive patients. *Clin Infect Dis.* 2001;33:1406-11.

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

Gautheret A, Aubin JT, Poirel L, Huraux JM, Nicolas JC, Rozenbaum W, Agut H. Detection of Human Betaherpesvirinae in saliva and urine from immunocompromised and immunocompetent subjects. *J Clin Microbiol.* 1997;35:1600-03.

Gérard I, Leport C, Flandre P. Cytomegalovirus (CMV) viremia and the CD4 lymphocyte count as predictors of CMV disease in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis.* 1997;24:836-40.

Gonçalves LS. Periodontite crônica e a infecção pelo HIV. Aspectos microbiológicos. *Revista APCD.* 2005;59:209-12.

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;35:838–45.

Greenspan D, Greenspan JS. Oral lesions of HIV infections: features and therapy. *AIDS Clin Rev.* 1990;81-93.

Griffin E, Krantz E, Selke S, Huang MIL, Wald A. Oral mucosal reactivation rates of herpesviruses among HIV-1 seropositive persons. *J Med Virol.* 2008;80:1153-9.

Griffiths PD. Herpesviruses and AIDS. *Scand J Infect Dis.* 1996;100 3–7.

Heurlin N, Brattstrom C, Lonnqvist B, Westman L, Lidman C, Andersson J. Aetiology of pulmonary diseases in immunocompromised patients. *Eur Resp J*. 1991;4:10-8.

Ho WZ, Harouse JM, Rando RF, Giincziil E, Srinivasan A, Plotkin SA. Reciprocal enhancement of gene expression and viral replication between human cytomegalovirus and human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol*. 1990;71:97-103.

Holmstrup P, Westergaard J. Periodontal disease in HIV infected patients. *J Clin Periodontol*. 1994;21:270-80.

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

Imbronito AV, Okuda OS, Maria de Freitas N, Moreira Lotufo RF, Nunes FD. Detection of herpesviruses and periodontal pathogens in subgingival plaque of patients with chronic Periodontitis, generalized aggressive Periodontitis, or gingivitis. *J Periodontol*. 2008;79:2313–21.

Lamster IB, Grbic JT, Mitchell-Lewis DA, Begg MD, Mitchell A. New concepts regarding the pathogenesis of periodontal disease in HIV infection. *Ann Periodontol*. 1998 Jul;3(1):62-75.

Leidner RS, Aboulafia DM. Recrudescence Kaposi's sarcoma after initiation of HAART: a manifestation of immune reconstitution syndrome. *AIDS Patient Care STD*. 2005; 19:635–44.

Li W, Yu S, Zhao H. Expression of MHC-I and MHC-II antigens in endomyocardial biopsies from patients with viral myocarditis and cardiomyopathy. *Chin Med J*. 1995;108:809-11.

Ling PD, Vilchez RA, Keitel WA, Poston DG, Peng RS, White ZS, Visnegarwala F, Lewis DE, Butel JS. Epstein-Barr virus DNA loads in adult Human Immunodeficiency Virus type 1- infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*. 2003;37:1244-9.

Lucht E, Heimdahl A, Nord CE. Periodontal disease in HIV- infected patients in relation to lymphocyte subsets and specific micro-organism. *J Clin Periodontol*. 1991;18:252-6.

Lusso P, Malnati M, Maria A, Balotta C, De Rocco SE, Markham PD, Gallo RC. Productive infection of cd4+ and cd8 mature human t cell populations and clones by human herpesvirus 6. *J Immunol.* 1991;147:685-91.

Mackowiack PA, Marling-Carson M, Smith JW, Luby JP. Antibody mediated bacterial adhesion to cytomegalovirus-induced Fc receptors. Potential relationship to secondary infections complicating herpesviruses infections. *J Clin Invest.* 1984;73:987-99.

Mardirossian A, Contreras A, Navazesh M, Nowzari H, Slots J. Herpesviruses 6, 7 and 8 in HIV- and non-HIV-associated Periodontitis. *J Periodontal Res.* 2000;35(5):278–84.

Martinez-Canut P, Guarinos J, Bagan JV. Periodontal disease in HIV seropositive patients and its relation to lymphocyte subsets. *J Periodontol.* 1996;67(1):33-6.

McKaig RG, Patton LL, Thomas JC, Strauss RP, Slade GD, Beck JD. Factors associated with Periodontitis in an HIV infected southeast USA study. *Oral Dis.* 2000;6:158–65.

Michalowicz BS, Ronderos M, Camara-Silva R, Contreras A, Slots J. Human herpesviruses and *Porphyromonas gingivalis* are associated with early-onset Periodontitis. *J Periodontol.* 2000;71:981–8.

Miller CS, Berger JR, Mootoor Y, Avdiushko SA, Zhu H, Kryscio RJ. High prevalence of multiple human herpesviruses in saliva from human immunodeficiency virus-infected persons in the era of highly active antiretroviral therapy. *J Clin Microbiol.* 2006;44:2409-15.

Miller SC. Viral infections in the immunocompetent patient. *Dermatol Clin.* 1996;14:225-41.

Moore LVH, Moore WEC, Riley C, Brooks CN, Burmeister JA, Smibert RM. Periodontal microflora of HIV positive subjects with gingivitis or adult Periodontitis. *J Periodontol.* 1993;64:48-56.

Murray PA, Grassi M, Winkler JR. The microbiology of HIV-associated periodontal lesions. *J Clin Periodontol.* 1989;16:636-42.

Murray PA, Winkler JR, Peros WJ, French CK, Lippke JA. DNA probe detection of periodontal pathogens in HIV-associated periodontal lesions. *Oral Microbiol Immunol*. 1991;6:34-40.

Nakou M, Kamma J, Gargalianos P, Laskaris G, Mitsis F. Periodontal microflora of HIV infected patients with Periodontitis. *Anaerobe*. 1997;3:97-102.

Ndiaye CF, Critchlow CW, Leggott PJ, Kiviat NB, Ndoye I, Robertson PB, Georgas KN. Periodontal status of HIV-1 and HIV-2 seropositive and HIV seronegative female commercial sex workers in Senegal. *J Periodontol*. 1997;68:827-31.

Nishiyama SA, Nakano V, Velasquez-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;54:326–30.

Nowzari H, Jorgensen MG, Contreras A, Slots J. Aggressive Periodontitis associated with Fanconi_s anemia. A case report. *J Periodontol*. 2001;72:1601–6.

Ongrádi J, Sallay K, Kulcsár G, Dán P, Horváth J, Nász I. Absorption of viruses into oral lymphocytes and decreased antibacterial activity of oral polymorphonuclear leukocytes. *Acta Microbiol Hungarica*. 1984;31:179-85.

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

Powers CJ, Fru K. Signal Peptide-Dependent Inhibition of MHC Class I Heavy Chain Translation by Rhesus Cytomegalovirus. *PLoS Pathog*. 2008;4:e1000150.

Rams TE, Andriolo M, Feik D, Abel SN, McGivern TM, Slots J. Microbiological study of HIV related Periodontitis. *J Periodontol*. 1991;62:74-81.

Redpath S, Angulo A, Gascoigne NR, Ghazal P. Murine cytomegalovirus infection down-regulates MHC class II expression on macrophages by induction of IL-10. *J Immunol*. 1999;162:6701- 7.

Reichart PA, Khongkhunthian P, Bendick C. Oral manifestations in HIV infected individuals from Thailand and Cambodia. *Med Microbiol Immunol*. 2003;192:157-60.

Reyburn HT, Mandelboim O, Váles-Gomes M, Davis DM, Pazmany L, Strominger JL. The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killers cells. *Nature*. 1997;386:514-7.

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

Rivero ER, Neves AC, Silva-Valenzuela MG, Sousa SO, Nunes FD. Simple salting-out method for DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Pathol Res Pract*. 2006;202:523-9.

Robinson PG, Boulter A, Birnbaum W, Johnson NW. A controlled study of relative periodontal attachment loss in people with HIV infection. *J Clin Periodontol*. 2000;27:273-6.

Rosen A, Gergeley P, Jondal M, Klein G, Britton S. Polyclonal Ig production after Epstein-Barr virus infection of human lymphocytes *in vitro*. *Nature*;1977;267:52-4.

Saygun I, Kubar A, Ozdemir A, Slots J. Periodontitis lesions are a source of salivary cytomegalovirus and Epstein–Barr virus. *J Periodontal Res*. 2005;40:187–91.

Saygun I, Kubar A, Ozdemir A, Yapar M, Slots J. Herpesviral-bacterial interrelationships in aggressive Periodontitis. *J Periodontal Res*. 2004;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, Özdemir A, Kurtis B, Yapar M, Kubar A, Özcan G. Detection of Human Viruses in Patients With Chronic Periodontitis and the Relationship Between Viruses and Clinical Parameters. *J Periodontol*. 2002;73:1437-43.

Scheutz F, Matee MIN, Andsager L, Holm AM, Moshi J, Kagoma C, Mpemba N. Is there an association between periodontal condition and HIV infection?. *J Clin Periodontol*. 1997;24:580-7.

Schwartz RA. Kaposi's sarcoma: an update. *J Surg Oncol*. 2004;87:146–51.

Scully C, Porter SR, Mutlu S, Epstein JB, Glover S, Kumar N. Periodontopathic bacteria in English HIV seropositive persons. *AIDS Patient Care STDS*. 1999;13:369-74.

Seymor GJ. Possible Mechanisms Involved in the Immunoregulation of Chronic Inflammatory Periodontal Disease. *J Dent Res*. 1987;66:1-9.

Slots J. Human viruses in Periodontitis. *Periodontol*. 2000. 2010;53:89-110.

Slots J, Contreras A. Herpesviruses: A unifying causative factor in Periodontitis? *Oral Microbiol Immunol*. 2000;15(5):277-80.

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

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

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):S3-28.

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

Sodeberg-Naucle C. Does cytomegalovirus play a causative role in the development of various inflammatory diseases and cancer?. *J Intern Med*. 2006;259:219-46.

Springer KL, Weinberg A. Cytomegalovirus infection in the era of HAART: fewer reactivations and more immunity. *J Antimicrob Chemother*. 2004;54:582-6.

Stashenko P, Dewhirst F, Peros W, Kent R, Ago J. Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. *J Immunol*. 1987;138:1464-8.

Stevens SJT, Blank BS, Smits PH. High Epstein-Barr virus (EBV) DNA loads in HIV infected patients: correlation with antiretroviral therapy and quantitative EBV serology. *AIDS*. 2002;16:993-1001.

Straus SE, Cohen JI, Tosato G, Meier J. NIH Conference. Epstein Barr- virus infection: biology, pathogenesis, and management. *Ann Intern Med*. 1993;118:45-58.

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

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

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.

Taga H, Taga K, Wang F, Chretien J, Tosato G. Human and viral interleukin-10 in acute Epstein-Barr virus induced infectious mononucleosis. *J Infect Dis*. 1995;171:1347-50.

Teanpaisan R, Douglas CW, Nittayananta W. Isolation and genotyping of black pigmented anaerobes from periodontal sites of HIV positive and non infected subjects in Thailand. *J Clin Periodontol*. 2001;28:311-8.

Tenenbaum H, Elkaim R, Cuisinier F, Dahan M, Zamanian P, Lang JM. Prevalence of six periodontal pathogens detected by DNA probe method in HIV vs non-HIV Periodontitis. *Oral Dis*. 1997;3 Suppl 1:S153-5.

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;86:175-80.

Ting M, Contreras A, Slots J. Herpesvirus in localized juvenile Periodontitis. *J Periodontal Res*. 2000;35:17-25.

Tomar SL, Swango PA, Kleinman DV, Burt BA. Loss of periodontal attachment in HIV-seropositive military personnel. *J Periodontol*. 1995;66:421–8.

Tsang CS, Samaranayake LP. Predominant cultivable subgingival microbiota of healthy and HIV-infected ethnic Chinese. *APMIS*. 2001 Feb;109(2):117-26.

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.

Wara-Aswapati N, Boch JÁ, Auron PE. Activation of interleukin one beta gene transcription by Human cytomegalovirus: molecular mechanisms and relevance to Periodontite. *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.

Winkler JR, Murray PA. Periodontal disease. A potential intraoral expression of AIDS may be rapidly progressive periodontitis. *CDA J*. 1987;15:20-4.

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.

Yeung SC, Stewart GJ, Cooper DA, Sindhusake D. Progression of periodontal disease in HIV seropositive patients. *J Periodontol*. 1993;64:651–7.

Zambon JJ, Reynolds HS, Genco RJ. Studies of the subgingival microflora in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J Periodontol*. 1990;61:699-704.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

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

DECLARAÇÃO
Protocolo 197/05

Declaramos que o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo recebeu e aceitou o adendo referente à inclusão dos fungos *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* para serem estudados nos pacientes da pesquisa: "Prevalência das bactérias *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus Actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Dialister* e dos vírus Epstein-Barr, Citomegalovírus e Herpes simples em saliva, bolsa periodontal e sangue periférico de pacientes HIV+ com Periodontite", de responsabilidade do(a) Pesquisador(a) Sabrina Rosa Grande, sob orientação do(a) Professor(a) Doutor(a) Luiz Antonio Pugliesi Alves de Lima e co-orientação do(a) Professor(a) Doutor(a) Fábio Daumas Nunes.

São Paulo, 28 de maio de 2009.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador