

Luciano Marques da Silva

ANÁLISE DA REATIVAÇÃO DO VÍRUS
HERPES SIMPLES TIPO 1 APÓS
PROCEDIMENTOS ODONTOLÓGICOS PELA
TÉCNICA DA REAÇÃO EM CADEIA DA
POLIMERASE

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Odontologia Área de Concentração Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia Área de Concentração Estomatologia.

Orientador: Prof Dr. Ricardo Santiago Gomez
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

Faculdade de Odontologia da UFMG

2006

Dedico este trabalho à minha família pelo amor e incentivo incondicional em todos os momentos dessa trajetória.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, saúde e iluminação.

À minha mãe, exemplo de garra e perseverança, pela referência de vida e por estar sempre apoiando e acreditando em mim (sem você nada seria possível).

Ao meu pai, exemplo de tranqüilidade e humildade, por toda convivência equilibrada e suporte necessário.

Ao meu orientador Prof Dr Ricardo Santiago Gomez por todo apoio, amizade, serenidade e pelo exemplo profissional.

Aos meus irmãos Dado e Luiz Sérgio e demais familiares por todo o carinho.

À Karine pela compreensão e amor compartilhado.

Aos professores do Departamento de Patologia e Cirurgia Prof. Dr. Wagner Castro, Prof. Dr. Ricardo Mesquita, Profa. Dra. Maria Cássia e Profa. Dra. Maria Auxiliadora pela oportunidade de trabalho e conhecimentos passados.

Aos Pacientes pela colaboração.

Ao Prof. Dr. Ricardo Rodrigues Vaz por ter aberto a primeira porta nesta faculdade para mim.

À Phoneutria por ter gentilmente nos cedido toda a Taq polimerase usada neste trabalho.

Aos amigos do laboratório de patologia odontológica André Luiz, Flávio, Jeane, Eliza, Carolina, Júnia, Sérgio Neves, Alessandra, Guilherme, Andresa e Marina.

Aos meus amigos de Pedro Leopoldo Rodrigo, Frederico, Bruno, Estevão e Roberta.

A todos os outros Professores da Faculdade de Odontologia pela ajuda.

Aos amigos da Patologia Martinho, Paulo, Sérgio Vitorino, Paolla, Vinicius, Paula, Dielle, Alfredo e Leandro Napier.

Aos amigos e alunos da graduação da FO-UFMG pela convivência.

Aos amigos da Clínica da Prefeitura de Pedro Leopoldo.

Aos Funcionários da FO-UFMG.

Às agências de fomento à pesquisa.

"A chegada não é nada se comparado ao caminho".
(Gandhi)

RESUMO

O vírus do herpes simples tipo 1 (HSV-1) é um vírus de DNA e um membro da família do herpesvírus humano (HHV). Em geral, mais de 90% da população apresentam anticorpos contra o HSV-1, sendo que 40% dessas pessoas têm susceptibilidade em desenvolver manifestações herpéticas secundárias. A reativação do HSV-1 na mucosa bucal pode ser induzida por vários fatores como stress, luz solar, menstruação e trauma físico. O objetivo do presente estudo foi avaliar o impacto de procedimentos cirúrgicos odontológicos na reativação do HSV-1 na mucosa bucal. Desta forma, 48 pacientes submetidos à extração dos terceiros molares e 48 pacientes submetidos a procedimentos restauradores não cirúrgicos (grupo controle) foram incluídos no estudo. Coleta de sangue venoso foi realizada para verificação de sorologia de IgG para o HSV-1. Raspados da mucosa bucal foram realizados antes e uma semana após o procedimento odontológico para investigação do vírus HSV-1, através da Nested-PCR. Os resultados não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre a frequência de raspados bucais positivos para o HSV-1 após cirurgia (4,2%), comparado com o grupo controle (2,1%). Estes dados demonstram que procedimentos cirúrgicos odontológicos não influenciam a reativação do HSV-1 na mucosa bucal.

SUMMARY

The herpes simplex virus type 1 (HSV-1), a DNA virus, is a member of the human herpesvirus family (HHV). The majority of the population (90%) have antibodies to HSV-1, and as many as 40% of these individuals may develop secondary herpes. Shedding of HSV-1 in the oral mucosa can be induced by many factors such as stress, sunlight, menstruation and physical trauma. The aim of the present study was to evaluate the impact of dentistry surgery procedure on HSV-1 shedding in the oral mucosa. Thereby, 48 patients submitted to extraction of the third molar and 48 patients submitted to restorative procedures were included in this study. Venous blood collection was performed in order to verify IgG sorology for HSV-1. Oral swabs were performed before and a week later the procedures in order to investigate HSV-1 by Nested-PCR. The results did not show any statistical differences between the frequency of positive individuals to HSV-1 after surgery (4.2%), compared to the control group (2.1%). There results indicate that shedding of HSV-1 in the oral mucosa is not increased by surgical trauma.

LISTA DE ABREVIATURAS

BLAST	basic local alignment search tool
cels/mm ³	células por milímetro cúbico
DATP	desoxi-adenosina trifosfato
DGTP	desoxi-guanosina trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNTP	desoxi-nucleotídeo trifosfato
DTTP	desoxi-tirosina trifosfato
EDTA	ácido tetra etileno diamino
ELISA	enzyme-linked immunoabsorbent assay
FO	Faculdade de Odontologia
HSV-1	vírus herpes simples tipo 1
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
Kb	quilo bases
Km ²	Quilômetro quadrado
ml	Mililitros
°C	graus Celsius
Oct 1	fator de transcrição de proteínas do hospedeiro octaméricas 1
Pb	pares de base
PCR	reação em cadeia da polimerase
pH	potencial hidrogeniônico

PM	peso molecular
T.E	Tampão tris-EDTA
Taq	<i>thermus aquaticus</i> DNA polimerase
TBE	Tampão tris borato EDTA
Tris	tris-hidroximetilaminometano
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VP 16	proteína viral 16
μl	micro litros

Nucleotídeos:

a - Adenina	c - Citosina
g - Guanina	t - Timina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Local do raspado na mucosa jugal	21
Figura 2- Gel de agarose contendo os produtos de PCR para detecção do HSV-1.	29
Figura 3- Gel de agarose a 1,5% mostrando a 2ª amplificação do DNA do HSV-1.....	33

LISTA DE QUADROS

Quadro 1– Iniciadores internos e externos do HSV-1.....	26
Quadro 2– Condições da PCR para HSV-1	Error! Bookmark not defined.
Quadro 3– Iniciadores para o gene da β globina	27
Quadro 4– Condições da PCR para o gene da β globina	28
Quadro 5– Soluções para revelar o gel de poliacrilamida a 6,5%	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Dados clínicos dos pacientes do grupo de estudo submetidos a procedimentos cirúrgicos.....	34
Tabela 2- Dados clínicos dos pacientes do grupo controle submetidos a procedimentos restauradores não cirúrgicos	35
Tabela 3- Comparação do número e percentual dos pacientes do grupo de estudo e controle positivos para o HSV-1 no PCR.....	37

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA	4
VÍRUS HERPES SIMPLES TIPO 1 (HSV-1)	5
HISTÓRIA NATURAL E CURSO CLÍNICO DA INFECÇÃO PELO HSV-1.....	6
TRATAMENTO DA INFECÇÃO PELO HSV-1.....	11
FATORES RELACIONADOS À RECORRÊNCIA.....	12
OBJETIVOS	16
OBJETIVO GERAL.....	17
OBJETIVO ESPECÍFICO	17
METODOLOGIA	18
ÁREA DE ESTUDO	19
DESENHO DE ESTUDO	19
POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	21
FONTES E CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE	22
GRUPO CONTROLE.....	23
FUNTE E CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE	23
EXTRAÇÃO DO DNA	24
REAÇÃO DE PCR PARA DETECÇÃO DO DNA DO HSV-1	24
REAÇÃO DE PCR PARA O GENE β -GLOBINA	27
ELETROFORESE PARA DNA EM GEL DE AGAROSE PARA HSV-1	28
ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA E COLORAÇÃO PELA PRATA PARA O GENE DA β GLOBINA	30
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
RESULTADOS	32
DADOS CLÍNICOS S DA POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	34
DISCUSSÃO	39
CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
ANEXOS	59
ANEXO-A- SEQUÊNCIA DO DNA - HSV-1.....	60
ANEXO-B- SOLUÇÕES UTILIZADAS NA EXTRAÇÃO DO DNA.....	61
ANEXO-C- SOLUÇÕES UTILIZADAS NA ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	64
ANEXO-D- SOLUÇÕES UTILIZADAS NA ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 6,5%.....	66
ANEXO-E- COMPROVANTE DO COMITÊ DE ÉTICA	69
ANEXO-F- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO PACIENTE	70

<i>ANEXO-G- TERMO DE COMPROMISSO DO PESQUISADOR.....</i>	<i>73</i>
<i>ANEXO-H- FICHA CLÍNICA DO PACIENTE.....</i>	<i>74</i>

INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

O vírus do herpes simples (HSV) é um vírus de DNA membro da família do herpesvírus humano (HHV), conhecido como *Herpetoviridae*. O HHV compreende mais de 70 membros conhecidos. Oito deles têm a capacidade de infectar o homem, incluindo entre eles, o HSV-1 (BARKVOLL & ATTRAMADAL, 1987). Mais de 90% da população, em geral, apresentam anticorpos contra o HSV-1, sendo que 40% dessas pessoas têm susceptibilidade em desenvolver manifestações herpéticas secundárias (LOGAN et al., 1998).

A prevalência do HSV-1 na população adulta é de 60 a 95%. O HSV-1 é capaz de causar lesões principalmente nas regiões ocular, bucal e genital, sendo que o contágio é através do contato direto entre indivíduos. O HSV-1 é o principal responsável pela maioria das infecções na região bucal (BARKVOLL & ATTRAMADAL, 1987; SCOTT et al., 1997b), é encontrado em aproximadamente 50% a 60 % de indivíduos da classe média e, em cerca de 90% de indivíduos das classes sócio-econômicas mais baixas (WOO & LEE, 1997).

Tem se estabelecido na literatura que inúmeros fatores podem causar a reativação do HSV-1. Debilidade orgânica, stress, luz solar, menstruação, traumas como o de extração dentária, imunossupressão (BARKVOLL & ATTRAMADAL, 1987; CHRISTIE et al., 1998; COUNTRERAS, 2001), descompressão do nervo trigeminal (SCULLY, 1989), mudanças hormonais (COUNTRERAS, 2001), terapias de

cânceres faciais, baixos níveis de ferro no sangue, radiação X (SCOTT et al., 1997b), idade avançada, alergias, alterações respiratórias (NEVILLE et al, 2004) tornam o vírus ativo, levando à recorrência (CHRISTIE et al., 1998).

HEDNER et al (1993b) sugerem que a cirurgia maxilofacial induz a reativação do HSV-1. A extração dentária pode levar a um trauma no nervo ou na sua terminação, causando a reativação do HSV-1 no gânglio trigeminal e a possibilidade de infecção recorrente na cavidade bucal. Trabalhos na literatura empregando métodos de cultura sugerem reativação assintomática do vírus HSV-1 após procedimentos odontológicos cirúrgicos. A proposta do presente trabalho é investigar através de um método mais sensível, a reação de Nested-PCR, se existe um espalhamento do HSV-1 na mucosa bucal após procedimentos odontológicos cirúrgicos e não cirúrgicos.

REVISÃO DE LITERATURA

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Vírus Herpes Simples Tipo 1 (HSV-1)

O vírus do herpes simples tipo 1 (HSV-1) é um vírus DNA e um membro da família do herpesvírus humano (HHV), conhecido como *Herpetoviridae*. Ele possui o DNA como material genético e é encapsulado. Os vírus da família *herpesviridae* têm o seu material genético variando de 120 a 230Kb dos quais 31 a 75% são guanina e citosina. No caso do HSV-1 seu genoma é de aproximadamente 150Kb, sendo 68% deste material guanina e citosina (ROIZMAN e WHITLEY, 2001).

O HSV-1 possui a habilidade de habitar por toda a vida no interior do hospedeiro infectado e os seres humanos são seus únicos reservatórios naturais. Ele dissemina-se predominantemente através da saliva infectada ou de lesões periorais ativas e se adapta melhor nas regiões oral, facial e ocular. Os sítios mais comumente envolvidos são a faringe, áreas intra-bucais, lábios, olhos e pele acima da cintura sendo que o contágio é através do contato direto entre pessoas (BARKVOLL & ATTRAMADAL, 1987; SCOTT et al., 1997a).

A prevalência de HSV-1 na população adulta em geral é de 60 a 95% sendo que é encontrado em aproximadamente 50% a 60 % de indivíduos da classe média e, em cerca de 90% de indivíduos das classes sócio-econômicas mais baixas (WOO & LEE, 1997). Muitas pessoas apresentam anticorpos contra o HSV-1, sendo que

40% dessas pessoas têm susceptibilidade em desenvolver manifestações herpéticas secundárias (LOGAN et al., 1998). Classes socioeconômicas baixas estão correlacionadas com a exposição precoce. Nos países pobres e em desenvolvimento, mais de 50% da população são expostas aos cinco anos de idade, 95% aos 15 anos de idade, e a quase totalidade, em torno dos 30 anos de idade (NEVILLE et al., 2004).

2.2- História natural e curso clínico da infecção pelo HSV-1

Em sua história natural, a infecção HSV-1 primária e o herpes labial recorrente são freqüentemente vistos na prática odontológica. A boca é um local muito comum de infecção primária pelo HSV-1. O espectro de infecção oral primária varia de subclínica ou infecções inaparentes até ulcerações extensas na mucosa jugal, língua e gengiva (HEDNER et al.,1990). O vírion do HSV consiste de quatro componentes principais: core (DNA), capsídeo, tegumento (substância fibrilar) e envelope. Durante a infecção, o vírus é inoculado no hospedeiro pelas células da pele, lábio ou mucosa. Ocorre então a interação do DNA viral com um complexo de multiproteínas formado pela proteína tegumentar VP16, o fator de transcrição de proteínas do hospedeiro octamérico (Oct 1) e outros fatores celulares (SONG et al., 2000; MOGENSEN e PALUDAN, 2001). Em torno de 15 a 18 horas após a infecção ocorre a transcrição dos genes do HSV-1 e então o vírus é encapsulado no núcleo da célula do hospedeiro. O vírus trafega no sentido retrógrado ao transporte axonal

para o corpo celular neuronal. Uma vez atingido o corpo neuronal o vírus pode evoluir para um ciclo lítico com auto-regulação ou entrar em latência. No ciclo lítico, os vírus recém-sintetizados são liberados (CLEMENTI, 2000; FLEMINGTON, 2001, WEIR, P.J. 2001, SCULLY, C. 1989).

A transmissão do HSV ocorre por contato direto de indivíduos soro negativos com as lesões ou secreções das vesículas ou da saliva, provenientes de indivíduos soropositivos para o HSV-1 (SCULLY, 1989). Segue-se assim, um período de incubação de 2 a 12 dias, quando a manifestação primária clínica aparece (CHRISTIE et al., 1998).

Durante a infecção, o vírus é inoculado ou ganha entrada no hospedeiro por células epiteliais da pele, lábio ou mucosa. Com 15 a 18 horas após a infecção, o DNA viral replicado é encapsulado por um novo capsídeo que é transportado da membrana do núcleo para a superfície celular. Com a lise da célula do hospedeiro, os vírus HSV recém-sintetizados são liberados. A manifestação clínica permanece por cerca de 1 a 3 semanas e grande quantidade de partículas virais são liberadas na saliva por um período médio de duração de 7 a 10 dias (OAKLEY et al., 1997).

A infecção primária ocorre usualmente nos primeiros anos de vida e é na maioria das vezes, cerca de 89 a 99%, assintomática (BARKVOLL & ATTRAMADAL, 1987; NISENGARD & NEWMAN, 1994; OAKLEY et al., 1997; SCOTT et al., 1997a), embora possa produzir gengivoestomatite herpética aguda em crianças e faringites ou amigdalites em adultos. A grande incidência de infecções pelo HSV-1 primária ocorre em crianças entre 6 meses a 3 anos de idade (WOO & LEE, 1997). O quadro

clínico sintomático do herpes primário é caracterizado por ulcerações bucais generalizadas (WHITLEY et al., 1998), gengivite, febre (39 a 40,5°C), linfadenopatias cervicais (SCULLY, 1989), anorexia e irritabilidade (WHITLEY et al., 1998). Tal quadro tende a ser mais grave em adultos e, em muitas ocasiões, em crianças são observadas manifestações extrabucais, como crostas de sangue nos lábios (SCULLY, 1989; CHRISTIE et al., 1998). As lesões aumentam de tamanho e desenvolvem áreas centrais de ulceração, recobertas por uma fibrina amarelada. As ulcerações podem coalescer e formar úlceras rasas e irregulares. Em casos brandos, geralmente, tais manifestações desaparecem dentro de 5 a 7 dias. Já nos casos mais graves, podem se estender por até 2 semanas (NEVILLE et al, 2004).

Segundo WHITLEY et al. (2002), as infecções primárias resultam em manifestações bucais por um período de no máximo 23 dias, com média de 7 a 10 dias. Tal autor cita ainda como diagnósticos diferenciais da gengivoestomatite herpética a herpangina, infecções na língua por cândida, mononucleose pelo vírus Epstein-Barr, lesões decorrentes de radioterapia e quimioterapia e síndrome de Stevens-Johnson.

Durante a infecção primária, indivíduos soro negativos imunocompetentes desenvolvem resposta humoral e mediada por células para o HSV-1. A resposta humoral é iniciada com IgM transitória e persiste com anticorpos IgG e IgA. Existe assim, uma relação direta entre a presença destes anticorpos com a severidade da manifestação primária. Já nas recorrências, não existe uma relação de maior ou

menor frequência e severidade das manifestações clínicas em relação aos isotipos de anticorpos (OAKLEY et al., 1997).

Segundo CHRISTIE et al. (1998) após a infecção inicial do HSV-1 na região orofacial, o vírus pode reativar e resultar em três formas diferentes de recorrência: herpes labial recorrente, herpes intrabucal recorrente e manifestações assintomáticas na saliva. Muitos pacientes são capazes de reconhecerem sinais e sintomas prodrômicos da lesão recorrente, como queimação, sensação de dormência e formigamento (OAKLEY et al., 1997; NEVILLE et al., 2004), dor e prurido (SCULLY, 1989; SCOTT et al., 1997b) antes do desenvolvimento dos sinais clínicos do herpes labial recorrente. Posteriormente, a mucosa afetada desenvolve numerosas vesículas puntiformes, que se rompem rapidamente e formam inúmeras lesões pequenas avermelhadas. Tanto a mucosa oral móvel quanto a aderida podem ser afetadas, e o número de lesões é altamente variável. A gengiva acometida também exhibe frequentemente erosões puntiformes características ao longo da margem gengival livre. Não é incomum o envolvimento da mucosa labial ultrapassando a linha úmida, para incluir a borda adjacente do vermelhão dos lábios. A auto-inoculação pode ocorrer para os dedos, olhos e áreas genitais (NEVILLE et al., 2004).

Além do herpes labial recorrente, podemos citar as lesões herpéticas intrabucais como forma de recorrência, frequentemente associadas à imunodepressão (CHRISTIE et al., 1998). Nestes casos as lesões geralmente são generalizadas. As lesões intrabucais aparecem como úlceras em qualquer lugar da

mucosa, usualmente no palato e na gengiva (SCULLY, 1989; SILVA et al, 2002). Pacientes transplantados de medula óssea ou órgãos diversos, mal nutridos, portadores de tumores malignos ou afetados por quadros de imunodeficiência são mais susceptíveis de desenvolverem lesões intrabucais recorrentes graves de herpes (BARRETT et al., 1986; OAKLEY et al., 1997; WOO & LEE, 1997). Nestes pacientes as ulcerações locais são mais extensas, causando dor considerável e aumentam a ocorrência de superinfecções por bactérias e fungos. As lesões são na maioria das vezes atípicas e demoram a cicatrizar, cerca de 28 dias (OAKLEY et al., 1997; GOMEZ et al., 2001). Recorrências em pacientes imunocompetentes são normalmente labiais e raramente intrabucais.

Existem crescentes evidências de muitos indivíduos, particularmente crianças, que periodicamente apresentam HSV-1 na saliva sem o desenvolvimento de nenhum sinal ou sintoma clínico (LEWIS, 2004; SILVA et al, 2005). Vários fatores podem ser responsáveis por essa reativação latente do HSV-1 nos indivíduos susceptíveis. As mais freqüentemente implicadas são stress emocional, doenças, luz solar, menstruação e trauma físico (LAMEY et al, 1997).

Como exames complementares para se diagnosticar infecção pelo HSV-1 Greenberg et al. (1969) usaram a cultura celular associado à análise do esfregaço e a sorologia. Bagg et al. (1989) usaram esfregaços para exame de imunofluorescência com um propósito de um diagnóstico mais rápido que a sorologia. Robinson et al. (1992) detectaram a presença do HSV-1 na saliva de pacientes usando a PCR. Tateishi et al. (1994) demonstraram uma maior sensibilidade da PCR

em relação à cultura viral e também ressaltaram que a PCR depende de menor tempo, fato este, observado também por Llorente et al. (1998). Knaup et al. (2000) mostraram uma maior sensibilidade do Nested-PCR quando comparado ao PCR convencional.

2.3- Tratamento da infecção pelo HSV-1

Atualmente mais de 30 agentes antivirais já foram aprovados para o tratamento das infecções virais (DE CLEREQ, E. 2001), sendo que alguns destes agentes serão abordados a seguir:

O aciclovir é um análogo acíclico do nucleosídeo guanina que carece de uma 3`- hidroxila na cadeia lateral. Seu espectro antiviral restringe-se aos herpesvírus. O mecanismo de ação do aciclovir é denominado inativação suicida, pois o molde de DNA é interrompido devido ao aciclovir ligar-se a enzima e conduzir à alteração irreversível da DNA polimerase (GOODMAN & GILMAN 1996, DE CLEREQ, E. 2001). A resistência viral ao aciclovir foi vinculada a um entre três mecanismos: ausência ou produção parcial de timidina quinase viral, alteração da especificidade de substrato da timidina quinase ou alteração do DNA da polimerase viral (PALLASCH, et al.1984). Entre os efeitos adversos, pela administração endovenosa do aciclovir, a insuficiência renal e irritação no local da injeção podem ser observados (WHITLEY, 2002). A via tópica, à base de propileno glicol, pode causar irritação das mucosas (GOODMAN & GILMAN 1996). Quanto ao uso terapêutico, o aciclovir é indicado para infecções por vírus da família *herpetoviridae*. O seu efeito é

melhor em infecções primárias do que nas recidivas. O unguento tópico do aciclovir não se associa a benefícios clínicos no herpes labial recorrente (GOODMAN & GILMAN 1996). Segundo HANN (1983), SHEEP et al. (1987) e EPSTEIN et al.(1996), o uso profilático do aciclovir é importante em pacientes que vão se submeter ao transplante de medula óssea.

O valaciclovir é uma pro droga éster l-valil do aciclovir, tem o mesmo espectro e mecanismo de ação do aciclovir. Sua indicação é para infecções por VZV e HSV, sendo administrado por via oral. Pode também ser usado como profilático de infecções por CMV em pacientes transplantados (DE CLEREQ, E. 2001). O mecanismo de ação e resistência é o mesmo do aciclovir (GOODMAN & GILMAN 1996, DE CLEREQ, E. 2001).

O foscarnet é um análogo inorgânico dos pirofosfatos que inibe todos os herpesvírus e o HIV. O mecanismo de ação do foscarnet é a ação direta com a DNA polimerase do herpesvírus ou com a transcriptase reversa do HIV. Não ocorre metabolismo intracelular significativo. Os efeitos indesejados principais são a nefrotoxicidade e a hipocalcemia sintomática (GOODMAN & GILMAN 1996).

2.4- Fatores relacionados à recorrência do HSV-1

Existem várias teorias sobre a reativação viral. A primeira é a teoria do ponto de gatilho na pele, surgida em 1970 (SCOTT et al., 1997b). Tal teoria sugere a possibilidade do HSV estar presente periféricamente na pele e nos tecidos bucais,

próximos às extremidades distais das terminações nervosas. Esta teoria baseia-se na suposição de que o HSV é constantemente produzido nos gânglios e periodicamente transportado para sítios distais via V nervo sensorial. Já a teoria de ponto de gatilho ganglionar sugere que a reativação do HSV requer um estímulo do vírus latente no gânglio, para que, posteriormente, o mesmo possa ser levado para a pele onde provocará as lesões. Nesta teoria o desequilíbrio entre a defesa do hospedeiro e a atividade viral levaria às manifestações de recorrência (LOGAN et al., 1998; COUNTRERAS, 2001).

Tem se estabelecido na literatura que inúmeros fatores podem causar a reativação do HSV-1. Debilidade orgânica, stress, luz solar, menstruação, traumas como de extração dentária, imunossupressão (BARKVOLL & ATTRAMADAL, 1987; CHRISTIE et al., 1998), descompressão do nervo trigeminal (SCULLY, 1989), estímulos químicos, febre, frio, fadiga, gravidez (BARKVOLL & ATTRAMADAL, 1987), mudanças hormonais (COUNTRERAS, 2001), terapias de câncer faciais (quimioterapia e radioterapia), baixos níveis de ferro no sangue, radiação X (SCOTT et al., 1997b), idade avançada, alergias, alterações respiratórias (NEVILLE et al., 2004) tornam o vírus reativo, levando à recorrência (CHRISTIE et al., 1998).

Um estudo longitudinal foi realizado pelo nosso grupo para investigar a frequência de reativação do HSV-1 na cavidade bucal em 25 pacientes soropositivos para este vírus, utilizando a técnica de Nested-PCR. Todos os voluntários, incluindo pacientes com história de HSV-1 recorrente e outros sem manifestações sintomáticas, revelaram o vírus HSV-1 no raspado pelo menos uma vez durante o

ano. Este estudo mostrou que o espalhamento viral ocorre independentemente da recrudescência do herpes labial (SILVA et al., 2005).

LEWIS, (2004) afirma que reativação herpética é observada significativamente mais freqüentemente na prática odontológica que na população em geral, (2,4% vs. 1,7%; $p < 0,01$).

No estudo de HEDNER et al., (1990), realizou-se uma investigação da reativação do HSV-1 e do seu papel no desenvolvimento de alvéolo seco após extração dentária em ratos. Amostras de alvéolos foram coletadas após uma semana do procedimento cirúrgico. Os resultados mostraram reativação viral e possivelmente associação com problemas de cicatrização, dor e exacerbação de processo inflamatório.

Injúria axonal em manipulação cirúrgica em humanos (HEDNER et al., 1993a) e ratos (HEDNER et al., 1993b) resulta em reativação do HSV-1. O autor, através de sorologia, encontrou HSV-1 em 5,1% dos pacientes submetidos à extração de 3º molar inferior que desenvolveram alvéolo seco após a cirurgia. Porém, este estudo de HEDNER et al., (1993a) avaliou a presença do vírus através de um método menos sensível, segundo a literatura pesquisada. Ambos os trabalhos sugerem que cirurgia maxilofacial induz a reativação do HSV-1. Durante a extração dentária, o nervo mandibular pode sofrer algum dano por causa da proximidade anatômica com o ápice radicular dos 3º molares inferiores. A extração dentária pode levar a um trauma do nervo ou sua terminação causando reativação latente do HSV-1 no

gânglio trigêmio e a possibilidade de infecção recorrente na cavidade bucal que resulta no atraso ou complicação da cicatrização (HEDNER et al., 1993a e b).

No estudo de WILLIAMSON, (1999) foi reportado um caso clínico no qual uma paciente apresentou a reativação do HSV-1 devido a procedimentos restauradores para confecção de uma coroa total metalocerâmica. Quatro dias após os procedimentos odontológicos, a paciente apresentou pequenas vesículas eritematosas na gengiva aderida ao dente preparado. Consultando um patologista bucal constatou-se tratar de uma manifestação recorrente do HSV-1 devido ao trauma ocorrido no local.

YURA et al. (2000), através de um caso reportado, sugere que HSV-1 pode induzir neuropatia do nervo trigêmio. A infecção primária do HSV-1 nem sempre acompanha sinais clínicos e sintomas e na maioria das vezes é subclínica. É possível que casos de paralisia do nervo mentual que eventualmente ocorram depois da extração dentária sejam resultantes da infecção secundária do HSV-1.

Todos esses dados demonstram que não existe na literatura um consenso sobre o impacto de procedimentos odontológicos na reativação do HSV-1 e o risco da transmissão deste vírus na prática odontológica. Este fato é importante na análise das medidas de biossegurança atualmente adotadas e nas implicações que uma possível reativação do HSV-1 pode ter no reparo e cicatrização da fenda cirúrgica.

OBJETIVOS

3- OBJETIVOS

3.1- OBJETIVO GERAL

Investigar o impacto de procedimentos cirúrgicos odontológicos na reativação do HSV-1 na mucosa bucal.

3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar, através do método da Nested-PCR, a reativação do HSV-1 na mucosa bucal de pacientes soropositivos submetidos a procedimentos odontológicos cirúrgicos e procedimentos odontológicos não cirúrgicos.

METODOLOGIA

4- METODOLOGIA

4.1- ÁREA DE ESTUDO

O município de Belo Horizonte está localizado na região centro – sul do estado de Minas Gerais. Possui uma extensão territorial de 331,94 Km² e 2.091.448 habitantes (fonte: <http://www.cidades.mg.gov.br/cidades/owa/menuprinc> 10/11/2003). É a capital estadual e município sede da Microrregião e da região metropolitana de Belo Horizonte.

O projeto de Extensão de Cirurgia Buco Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da UFMG é uma referência para atendimento odontológico de pacientes que necessitam remover 3º molar em Minas Gerais.

4.2- DESENHO DO ESTUDO

O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/UFMG), obedecendo ao exigido pela legislação brasileira, conforme as resoluções CNS nº 196/96 e 304/00 do Conselho Nacional de Saúde, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos. O projeto foi aprovado em 13 de abril de 2005 através do Parecer de nº ETIC 039/05.

O indivíduo ou responsável foram esclarecidos sobre os objetivos da pesquisa e solicitada a assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido de todos os pacientes para a participação da pessoa (Anexo F). O paciente só participou da pesquisa após leitura e assinatura, de livre e espontânea vontade, desse documento. Também foi realizado o preenchimento de um termo de compromisso da utilização de dados pelo pesquisador (Anexo G).

É oportuno ressaltar que todas as pessoas envolvidas na manipulação dos dados obtidos na pesquisa: pesquisador, orientador ou possíveis colaboradores tiveram compromisso com a privacidade e a confiabilidade dos dados utilizados, que foram protegidos durante todo o projeto, preservando integralmente o anonimato dos pacientes.

A pesquisa foi conduzida de forma a permitir a todos, exercerem suas responsabilidades próprias diante das situações derivadas do avanço da mesma. Os referidos dados obtidos somente foram utilizados para o projeto ao qual se vincularam, sendo que todo e qualquer outro uso deverá ser objeto de novo projeto de pesquisa.

População de estudo

Foi realizado um estudo transversal usando a Nested-PCR como teste diagnóstico. Os indivíduos incluídos foram pacientes da Faculdade de Odontologia da UFMG (FO-UFMG). Foram avaliados no projeto um total de 96 pacientes, divididos em dois grupos. O primeiro foi formado por 48 indivíduos com indicação para extração de terceiros molares inferiores inclusos e semi-inclusos. O segundo foi formado por 48 pacientes que foram submetidos a pequenos procedimentos restauradores, incluindo restaurações de amálgama e resina composta. Todos os pacientes foram submetidos à raspagem de mucosa jugal antes e uma semana após o procedimento odontológico (Figura 1).



Figuras 1 - Local do raspado na mucosa jugal.

Os raspados foram realizados com espátulas plásticas estéreis e armazenados em Eppendorf de 1500 μ L contendo uma solução tampão de Krebs e em seguida congelados a -20°C . Os pacientes também foram submetidos à coleta

de três ml de sangue por via endovenosa para verificação de sorologia de IgG para HSV-1 analisados no Laboratório Geraldo Lustosa.

Fontes e critérios de elegibilidade

A seleção do grupo de estudo foi realizada na clínica do projeto de Cirurgia Buco-maxilo-facial da FO-UFMG através dos seguintes critérios de inclusão e exclusão:

Os critérios para inclusão:

- A) Pacientes que realizaram cirurgia de 3º molar incluso ou semi-incluso.
- B) Pacientes que retornaram após 7 dias da cirurgia para nova coleta de raspado e coleta de sangue.

Os critérios de exclusão:

- A) Pacientes que não concordaram em participar do estudo.
- B) Pacientes que na primeira coleta mostraram raspados bucais positivos na PCR para HSV-1;
- C) Pacientes que na PCR para β -Globina mostraram resultados negativos.
- D) Pacientes que no teste de sorologia para HSV-1 foram negativos.

GRUPO CONTROLE

Fonte e critérios de elegibilidade

O grupo controle foi formado por pacientes atendidos nas clínicas de dentística da FO-UFMG.

Os critérios para inclusão:

- A) Pacientes que foram submetidos a restaurações de resina ou amálgama.
- B) Pacientes que retornaram após 7 dias do procedimento para nova coleta de raspado e coleta de sangue.

Os critérios de exclusão:

- A) Pacientes que não concordaram em participar do estudo.
- B) Pacientes que na primeira coleta mostraram raspados bucais positivos na PCR para HSV-1;
- C) Pacientes que na PCR para β -Globina mostraram resultados negativos.
- D) Pacientes que no teste de sorologia para HSV-1 foram negativos.

4.3- EXTRAÇÃO DO DNA

A extração do DNA foi realizada segundo técnica descrita por BOOM et al.,(1990). Ao produto das raspagens foi adicionado 450 µL de tampão de lise (970 mg/mL GuHCl, 0,1 mol/L Tris-HCl pH 6.4, 0,2 mol/L EDTA pH 8.0, 26mg/mL Triton X-100) e 20µL de suspensão de sílica. A mistura foi agitada em vortex por alguns segundos, incubada em banho de areia a 56°C por 10 minutos e posteriormente centrifugada em microcentrífuga (10000 rpm/min). Após o descarte do sobrenadante, o pellet de sílica foi lavado 2 vezes com tampão de lavagem (970 mg/mL GuHCl, 0,1 mol/L Tris HCl pH 4.0), repetindo-se a centrifugação entre cada lavagem. Outras duas lavagens sucessivas foram realizadas com etanol 70% e uma última com acetona. O sobrenadante foi descartado e a sílica secada a 56°C (3 a 5 minutos). Posteriormente foi adicionado 100 µL de tampão TE, agitado em vortex e incubado a 56°C por 30 minutos. Finalmente, a mistura foi centrifugada por 2 minutos e o sobrenadante contendo o DNA transferido para outro tubo. O DNA extraído foi estocado a -20°C e, posteriormente, utilizado para amplificação das regiões escolhidas pela técnica de PCR.

4.4- REAÇÃO DE PCR PARA DETECÇÃO DO DNA DO HSV-1

A técnica utilizada neste estudo foi Nested-PCR. A técnica consiste no uso de dois pares de iniciadores (primers). Estes pares foram nomeados em M e N

(externos) e O e P (internos). Os iniciadores foram descritos por Victória et al (2005) e suas seqüências estão no quadro 1. Esta técnica foi escolhida por apresentar alta sensibilidade e alto grau de precisão uma vez que a amplificação realizada pelos iniciadores internos praticamente elimina a possibilidade de uma amplificação inespecífica (PINA *et al.*, 1998; FABRIS *et al.*, 1998; HAMPRECHT *et al.*, 1998; DALAPATHY *et al.*, 1998; AONO *et al.*, 1998).

O número de ciclos de amplificação foi 30. As temperaturas de anelamento foram de 60°C para a primeira e 61°C para a segunda reação. As temperaturas e tempos da desnaturação inicial, desnaturação, extensão e extensão final foram respectivamente de 95°C por 2', 95°C por 30'', 72°C por 30'' e 72°C por 5' nas duas reações. O tampão usado tinha a seguinte composição MgCl₂ 1,50mM, KCl 50mM, Tris-HCl pH 8,4 10mM e Triton X-100 0,1%. A concentração dos componentes está disposta no quadro 2.

Quadro 1 – Iniciadores internos e externos do HSV-1

Iniciadores Externos	Iniciadores Internos
M 5' TGC TGG AGG ATC ACG AGT TTG 3'	O 5' TGC AGA GCA ACC CCA TGA AG 3'
N 5' CAC CGT CTT TGT TGG GAA CTT G 3'	P 5' ATG ACC ATG TCG GTG ACC TTG G 3'

Quadro 2 – Condições da PCR para HSV-1

Componentes	Concentração
Iniciadores	20 pmols de cada
Desoxinucleotídeos Trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,2 mM de cada
DNA	6 µl
Taq DNA Polimerase	1 ou 2 unidades por reação
Tampão	MgCl ₂ 1,50 mM, KCl 50 mM, Tris-HCl pH 8,4 10 mM e Triton X-100 0,1%
Volume total de reação 50 µl	

4.5- REAÇÃO DE PCR PARA O GENE β -GLOBINA

A técnica foi usada para comprovar sucesso na coleta e extração de DNA evitando assim a interpretação de resultados falso negativos. Os iniciadores foram descritos por Gall-Troselj et al. (2001) e as suas seqüências estão no quadro 3.

Quadro 3 – Iniciadores para o gene da β globina

Iniciador senso	Iniciador anti-senso
M 5´ CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3´	O 5` GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC 3`

O número de ciclos de amplificação foi 35. As temperaturas e tempos de desnaturação inicial, desnaturação, anelamento, extensão e extensão final foram respectivamente de 94°C por 3´, 95°C por 45´´, 56°C por 30´´, 72°C por 30´´ e 72°C por 10´. O tampão usado tinha a seguinte composição MgCl₂ 20 mM, KCl 50mM e Tris-HCl pH 8,4 10mM. A concentração entre os componentes está disposta no quadro 4.

Quadro 4 – Condições da PCR para o gene da β globina

Componentes	Concentração
Iniciadores	20 pmols de cada
Desoxinucleotídeos Trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,2 mM de cada
DNA	3 μ l
Taq DNA Polimerase	2 unidades por reação
Tampão	MgCl ₂ 2 mM, KCl 50 Mm, Tris-HCl pH 8,4 10 mM e Triton X-100 0,1%
Volume total de reação 25 μl	

4.6- ELETROFORESE PARA DNA EM GEL DE AGAROSE PARA HSV-1

O gel de agarose para eletroforese apresentou a concentração de 1,5%, diluído em tampão TAE (1x), e a cuba usada foi a International Biotechnologies MPA. Os produtos da PCR foram aplicados em tampão de amostra (Loading Buffer) e submetidas a 165V e a uma corrente de 110 mA por 45 minutos. A fonte utilizada foi a Amersham Pharmacia Biotech EPS 301. A revelação consistiu em banho do gel por 30 minutos em solução de brometo de etídio a 0,5g/ml e o gel foi examinado em luz ultravioleta (Vilber Loumart TFP-M/WL). O padrão de peso molecular foi o 100pb DNA Ladder.

O sinal de amplificação final apareceu como uma banda bem definida e individualizada de 241 pb (figura 2), no gel de agarose a 1,5% corado pelo brometo de etídio. O produto da PCR do 1º round foi de 663pb (figura 2). Em todas as reações foram utilizados controle positivo e negativo. O controle positivo consistiu de uma amostra de raspado de um paciente com lesão clínica causada por HSV-1 com o diagnóstico comprovado por citologia esfoliativa.

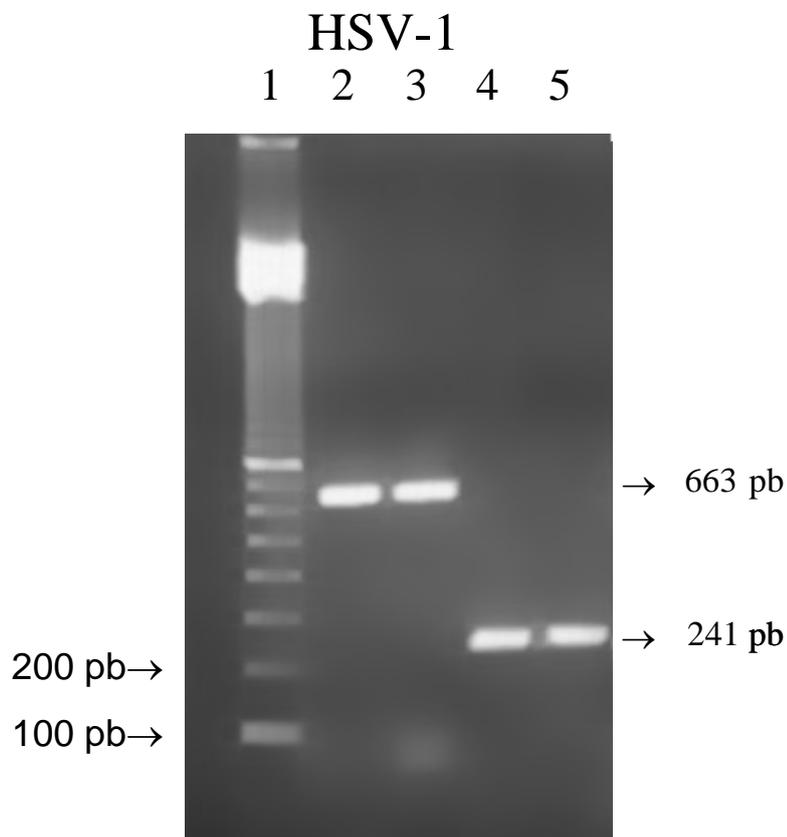


Figura 2 - Gel de agarose contendo os produtos de PCR para detecção do HSV-1. 1º round (canaletas 2 e 3) e do 2º Round (canaletas 4 e 5). Canaleta 1 padrão 100pb DNA Ladder.

4.7- ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA E COLORAÇÃO PELA PRATA PARA O GENE DA β GLOBINA

Os produtos da PCR foram verificados através da eletroforese em gel de poliacrilamida. Foram aplicados 5 μ l de cada produto juntamente com 1 μ l de gel loading buffer (GLB) nas canaletas do gel a 6,5%. A corrida foi realizada em tampão TBE 1x, a 160V, durante aproximadamente 30 minutos, utilizando-se cuba específica (mini vertical gel electrophoresis unit, Sigma). Posteriormente, cada gel foi corado pela prata para verificação e análise do material amplificado, seguindo-se uma adaptação do método descrito por Bassam et al. (1991), que consiste na imersão de cada gel em uma série de soluções específicas, numa ordem e tempo definidos (quadro 5). Após o término do processo, os géis foram secos em papel celofane rico em celulose.

O sinal de amplificação apareceu como uma banda bem definida e individualizada de 268 pb, no gel de poliacrilamida a 6,5% corado com prata.

Quadro 5 – Soluções para revelar o gel de poliacrilamida a 6,5%

Soluções	Tempo Regular
Ácido acético 10%	10 minutos
Água destilada	3 minutos
Solução de prata	8 a 10 minutos
Água destilada	30 segundos (2 lavagens)
Solução reveladora	Variável

4.8- ANÁLISE ESTATÍSTICA

A frequência das amostras positivas para o HSV-1 no grupo de estudo e no grupo controle foram analisadas pelo teste de Fisher e qui quadrado. O nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS

5 - RESULTADOS

Uma imagem de um gel representativo dos resultados da Nested-PCR para detecção de HSV-1 pode ser observado na figura 3.

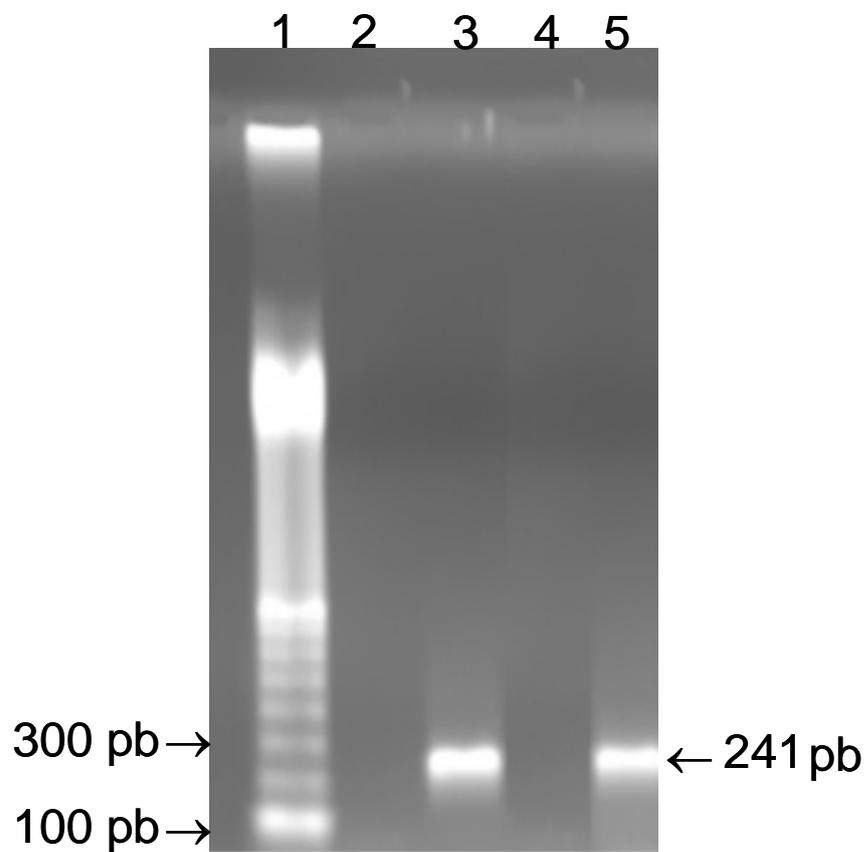


Figura 3 - Gel de agarose a 1,5% mostrando a 2ª amplificação do DNA do HSV-1. Canaleta 1: padrão de peso molecular. Canaleta 2: controle negativo. Canaleta 3: controle positivo. Canaleta 4: amostra negativa. Canaleta 5: amostra positiva.

5.1- DADOS CLÍNICOS DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

Inicialmente, o grupo de estudo foi formado por 80 indivíduos. Desse total, 20 pacientes não retornaram a segunda consulta, necessários para a coleta de sangue e de novo raspado bucal, um paciente mostrou raspado bucal positivo para o HSV-1 na primeira consulta e 11 foram negativos para o HSV-1 nos exames sorológicos. Nenhum raspado apresentou resultado negativo para a β -Globina. Desta forma, considerando os critérios de exclusão, ao final o nosso grupo de estudo ficou com 48 pacientes, com média de idade de 22,9 anos \pm 20,8 (variação de 17 até 31 anos). Este grupo foi composto por 13 indivíduos do sexo masculino e 35 do sexo feminino e os dados clínicos deles seguidos dos resultados dos raspados após os procedimentos cirúrgicos estão dispostos na tabela 1.

Tabela 1 - Dados clínicos dos pacientes do grupo de estudo submetidos a procedimentos cirúrgicos.

nº	Idade	Sexo	PCR pós cirurgia	Observação	Nº	Idade	Sexo	PCR pós cirurgia	Observação
1	25	Masc	-	48 Inclusivo	28	24	Fem	-	38 Semi-I
2	29	Fem	-	38 Inclusivo	29	29	Fem	-	48 Semi-I
3	27	Fem	+	38 Inclusivo	30	23	Fem	-	38 Semi-I
4	22	Fem	-	28 Inclusivo	31	21	Fem	-	28/38 Semi
5	31	Fem	-	38 Semi-i	32	24	Masc	-	18/48 Semi
6	20	Masc	-	28/38Semi	34	21	Fem	-	18/48 Semi
7	25	Fem	-	18/48Semi	35	22	Fem	-	38 Inclusivo
8	18	Fem	-	38 Inclusivo	37	18	Masc	-	18/48 Semi
9	22	Fem	-	18/48Semi	38	23	Fem	-	18/38 Semi
10	23	Fem	-	48 Semi-I	39	25	Fem	-	18/48 Semi
11	18	Masc	-	28/38 Inc.	40	28	Masc	-	38 Semi-I
12	25	Fem	-	38 Inclusivo	41	20	Masc	-	38 Inclusivo
13	17	Fem	-	48 Semi-I	43	20	Masc	-	18/28 Semi
15	18	Fem	+	48 Inclusivo	44	22	Fem	-	38/48 Semi
16	25	Masc	-	38 Inclusivo	45	18	Fem	-	38/48 Semi
17	21	Fem	-	18/48Semi	46	18	Fem	-	48 Inclusivo
18	26	Fem	-	38 Inclusivo	47	31	Fem	-	38 Semi-I
19	23	Fem	-	28/38Semi	48	20	Masc	-	38 Inclusivo
20	22	Fem	-	18/48Semi	50	26	Fem	-	18 Inclusivo
21	24	Fem	-	28/38Semi	51	20	Fem	-	28/38 Semi
22	22	Fem	-	18 Inclusivo	52	22	Fem	-	18/48Semi
24	22	Masc	-	38 Semi-I	54	24	Fem	-	18/48 Semi
25	26	Fem	-	38 Semi-I	60	25	Masc	-	18/48 Semi
26	22	Masc	-	18/48Semi					
27	20	Fem	-	28 Inclusivo					

Inicialmente, o grupo controle foi formado por 62 indivíduos. Desse total, 14 pacientes não retornaram a segunda consulta, necessários para a coleta de sangue e de novo raspado bucal, nenhum paciente mostrou raspado bucal positivo para o HSV-1 na primeira consulta, nenhum foi negativo para o HSV-1 nos exames sorológicos e nenhum raspado apresentou resultado negativo para a β -Globina. Desta forma, considerando os mesmos critérios de exclusão, ao final o nosso grupo

controle foi constituído por 48 indivíduos com média de idade de 24 anos \pm 21,4 (variação de 18 até 31 anos). Este grupo foi composto por 18 homens e 30 mulheres e os dados clínicos deles e os resultados dos raspados após os procedimentos de dentística estão dispostos na tabela 2.

Tabela 2 - Dados clínicos dos pacientes do grupo controle submetidos a procedimentos restauradores não cirúrgicos.

Nº	Idade	Sexo	PCR pós proced.	Observação	Nº	Idade	Sexo	PCR pós proced.	Observação
1	25	Masc	-	Resina	27	29	Fem	-	Resina
2	29	Fem	-	Amálg.	28	23	Fem	-	Resina
3	27	Fem	-	Amálg.	29	21	Fem	-	Resina
4	27	Fem	-	Resina	30	24	Masc	-	Amálg.
5	31	Fem	-	Resina	31	25	Fem	-	Resina
6	23	Masc	-	Amálg.	32	22	Fem	-	Resina
7	25	Fem	+	Resina	33	19	Masc	-	Resina
8	18	Fem	-	Resina	34	25	Fem	-	Resina
9	22	Fem	-	Amálg.	35	25	Fem	-	Amálg.
10	24	Fem	-	Amálg.	36	28	Masc	-	Resina
11	18	Masc	-	Amálg.	37	24	Masc	-	Amálg.
12	25	Fem	-	Resina	38	23	Masc	-	Resina
13	21	Fem	-	Amálg.	39	22	Fem	-	Resina
14	18	Fem	-	Resina	40	23	Fem	-	Resina
15	25	Masc	-	Amálg.	41	19	Fem	-	Amálg.
16	23	Fem	-	Resina	42	31	Fem	-	Resina
17	26	Fem	-	Resina	43	24	Masc	-	Resina
18	23	Fem	-	Resina	44	26	Fem	-	Amálg.
19	24	Fem	-	Resina	45	20	Fem	-	Resina
20	24	Fem	-	Resina	46	25	Fem	-	Resina
21	27	Fem	-	Resina	47	24	Fem	-	Resina
22	22	Masc	-	Amálg.	48	26	Masc	-	Amálg.
23	26	Fem	-	Resina					
24	22	Masc	-	Amálg.					
25	25	Fem	-	Resina					
26	24	Fem	-	Resina					

A distribuição das amostras positivas dos pacientes do grupo de estudo e controle está descrita na tabela 3. Os dados não mostraram relação alguma entre o procedimento odontológico específico e a reativação do HSV-1. Do total de amostras, 4,2% dos pacientes apresentaram pelo menos um raspado positivo para o HSV-1 após cirurgia e 2,1% após o procedimento de dentística.

Dos 48 pacientes incluídos no trabalho que sofreram cirurgia, dois apresentaram um raspado positivo após o procedimento odontológico, sendo que um deles mostrou concomitantemente lesões herpéticas no lábio inferior. Ambos foram submetidos a cirurgia de 3º molar inferior incluso. No grupo controle apenas um paciente dos 48 incluídos no trabalho apresentou PCR positivo no raspado após ser submetido a uma restauração de resina composta.

Tabela 3 - Comparação do número e percentual dos pacientes do grupo de estudo e controle positivos para o HSV-1 no PCR.

	PCR +	PCR -
Grupo de Estudo	2 (4,2%)	46(95,8%)
Grupo Controle	1 (2,1%)	47 (97,9%)

Qui quadrado= 0,34 p= 1,00

Na comparação da positividade da PCR para o HSV-1 nos pacientes em relação às diferentes modalidades cirúrgicas, apenas dois dos 17 pacientes (11,8%) que foram submetidos a exodontia de 3º molar incluso mostraram PCR positivo para o HSV-1, enquanto que nenhum dos 31 pacientes submetidos a exodontia de 3º molar semi-incluso mostrou a reativação por este vírus.

Em outra comparação da positividade da PCR para o HSV-1 e a quantidade de cirurgias submetidas, observamos que dois dos 26 pacientes (7,7%) que foram submetidos a extração de um 3º molar foram PCR positivos para o HSV-1, enquanto que nenhum dos 22 pacientes submetidos a exodontia de dois elementos dentários mostrou a reativação por este vírus.

DISCUSSÃO

6-DISCUSSÃO

Muitas pessoas (mais de 90% da população em geral) apresentam anticorpos contra o HSV, sendo que 40% dessas têm susceptibilidade de desenvolver manifestações herpéticas secundárias (LOGAN et al., 1998).

A prevalência do HSV-1 na população adulta em geral é de 60 a 95%. O HSV-1 é capaz de causar lesões principalmente nas regiões ocular, bucal e genital, sendo que o contágio é através do contato direto de uma pessoa para outra. O HSV-1 é a forma mais comum e é o responsável pela maioria das infecções na região bucal (BARKVOLL & ATTRAMADAL, 1987; SCOTT et al., 1997b). Este é encontrado em aproximadamente 50% a 60 % de indivíduos da classe média e, em cerca de 90% de indivíduos das classes sócio-econômicas mais baixas (WOO & LEE, 1997).

A prevalência subclínica do HSV-1 é um assunto controverso na literatura. Vários trabalhos se propuseram a elucidar esta questão, porém resultados conflitantes foram encontrados na literatura. Muitos indivíduos periodicamente apresentam HSV-1 na saliva sem o desenvolvimento de nenhum sinal ou sintoma clínico (LEWIS, 2004; SILVA et al, 2005). Vários fatores podem ser responsáveis por essa reativação latente do HSV-1 nos indivíduos susceptíveis. As mais freqüentemente implicadas são stress emocional, doenças, luz solar, menstruação e trauma físico (LAMEY et al, 1997).

O HSV-1 e o HSV-2 são estruturalmente similares, compartilham muitos antígenos e são cerca de 50% geneticamente homólogos (SCULLY, 1989; NISENGARD & NEWMAN, 1994; WHITLEY, 2002). Além disso, os dois exibem variações epidemiológicas. O HSV-1 dissemina-se predominantemente através da saliva infectada ou de lesões periorais ativas e se adapta melhor nas regiões oral, facial e ocular. Os sítios mais comumente envolvidos são a faringe, áreas intra-buciais, lábios, olhos e pele acima da cintura sendo que o contágio é através do contato direto de uma pessoa para outra (BARKVOLL & ATTRAMADAL, 1987; SCOTT et al., 1997b).

O HSV-2 adapta-se melhor às regiões genitais, sendo transmitido, predominantemente, através do contato sexual, envolvendo a genitália e a pele abaixo da cintura, mas podem ocorrer exceções a estas regras. As lesões clínicas de ambos os tipos são idênticas e os dois provocam as mesmas reações teciduais (NEVILLE et al, 2004).

Mesmo assim, SCOTT et al. (1997b) relataram que podem existir co-infecções de ambos os subtipos virais (HSV-1 e HSV-2), ou superinfecções com subtipos do HSV-1 em indivíduos, principalmente imunossuprimidos, que apresentam evidências sorológicas de infecções prévias por HSV-1. Já SCULLY (1989), citou que infecções bucais prévias com HSV-1 conferem proteção relativa contra infecções genitais pelo HSV-2. Anticorpos para um subtipo de HSV diminuem as chances de infecção por outro subtipo, ou mesmo, reduzem a gravidade e o

tempo de permanência da manifestação clínica do segundo subtipo de HSV incubado (NEVILLE, 2004).

A detecção do HSV-1 usando a técnica da PCR demonstra ter maior sensibilidade quando comparada com a tradicional cultura viral (TATEISHI et al 1994; SCOTT et al 1997a). Em alguns trabalhos, a identificação do HSV-1 foi possível apenas através da Nested-PCR (KNAUP et al, 2000). Esta técnica apresenta alta sensibilidade e alto grau de precisão uma vez que a amplificação realizada pelos iniciadores internos praticamente elimina a possibilidade de uma amplificação inespecífica (PINA *et al.*, 1998; FABRIS *et al.*, 1998; HAMPRECHT *et al.*, 1998; DALAPATHY *et al.*, 1998; AONO *et al.*, 1998).

A presença do HSV-1 foi estudada por TATEISHI et al. (1994) em 1000 pacientes. Este trabalho tinha o objetivo de comparar a cultura viral e a PCR no diagnóstico subclínico do herpes labial. Os resultados encontrados foram de 4,7% de positividade para HSV-1 usando a PCR e 2,7% de positividade usando a cultura viral.

Já SCOTT et al. (1997a) fizeram um estudo sobre a presença do HSV-1 no período prodromico do herpes labial. A cultura viral, a PCR e a PCR associada à ELISA foram avaliadas como exames para o diagnóstico. O método mais sensível foi a PCR associada à ELISA com 45% de resultados positivos, seguida da PCR e cultura viral com 36% e 0%, respectivamente.

A reativação do HSV-1 na mucosa bucal tem sido estudada por vários autores.

Um estudo longitudinal foi realizado por KNAUP et al. (2000). Foram selecionados 30 pacientes, sendo 25 destes soropositivos para o HSV-1. Foram realizadas de oito a doze coletas nos pacientes num período de 58 a 167 dias. Dos pacientes soropositivos, 76% tiveram pelo menos um resultado positivo da PCR e 68% tiveram apenas recorrência assintomática do HSV-1.

Já no estudo longitudinal de SILVA et al (2005), investigou-se a freqüência da reativação do HSV-1 na cavidade bucal em 25 pacientes soropositivos para este vírus, utilizando a técnica de Nested-PCR. 100% dos voluntários revelaram este vírus na saliva pelo menos uma vez durante o ano. Este trabalho mostrou que o espalhamento viral ocorre independentemente da recrudescência do herpes labial.

Altos níveis de ansiedade combinado com o trauma da cirurgia odontológica resultam no aumento da reativação do HSV-1 na saliva (KAMEYAMA et al, 1989). LEWIS (2004) afirma que reativação herpética ocorre significativamente mais freqüente na prática odontológica que na população em geral, (2,4% vs. 1,7%; $p < 0,01$).

Entretanto, não existe na literatura um consenso sobre o impacto de procedimentos odontológicos na reativação do HSV-1 e o risco da transmissão deste vírus na prática odontológica. Este fato pode ter importantes implicações nas práticas de biossegurança e efeitos indesejáveis no processo cicatricial de fendas cirúrgicas.

Considerando as evidências que mostram a reativação clínica e assintomática do HSV-1 em pessoas submetidas à procedimentos odontológicos, o presente

trabalho verificou através de um método mais sensível, a reação de Nested-PCR, se existe um espalhamento do HSV-1 após procedimentos odontológicos cirúrgicos e não cirúrgicos.

No presente estudo, apenas 4,2% dos pacientes soropositivos para o HSV-1 submetidos à cirurgia odontológica apresentaram reativação na mucosa bucal. Este valor não foi estatisticamente diferente do encontrado na população de indivíduos submetidos à procedimentos não cirúrgicos (2,1%). Os nossos resultados são muito próximos aos do estudo de HEDNER et al (1993a), através de sorologia, que encontrou HSV-1 em 5,1% dos pacientes submetidos à extração de 3º molar inferior que desenvolveram alvéolo seco após a cirurgia.

Em nosso estudo foi observado também que a presença do HSV-1 na remoção de 3º molar incluso foi detectada em 11,8% dos pacientes. Enquanto que na remoção de 3º molar semi-incluso, nenhum caso de positividade foi detectado. Em relação ao número de dentes extraídos, observamos que quando removido um elemento dentário, 7,7% dos pacientes tiveram reativação do HSV-1 enquanto que nenhum paciente que removeu dois dentes mostrou presença deste vírus no raspado. Para validar estas informações, novos estudos com um número maior de amostras são necessários.

No presente estudo também foi observada a reativação do HSV-1 em um paciente que apresentou lesões herpéticas no lábio inferior uma semana após a cirurgia. Como a prevalência de herpes labial recorrente na população em geral é

significativa (1,7%), é possível que o procedimento cirúrgico tenha tido pequeno ou nenhum efeito sobre este processo.

Por fim, o presente trabalho demonstra que cirurgias odontológicas não aumentam a reativação do HSV-1 na mucosa bucal, comparado com procedimentos odontológicos não cirúrgicos. Apesar do pequeno número de casos que mostraram reativação do HSV-1 na mucosa bucal após procedimentos cirúrgicos, os efeitos desta reativação merecem novos estudos.

CONCLUSÃO

7 – CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo mostram que procedimentos cirúrgicos odontológicos não influenciam a reativação do HSV-1 na mucosa bucal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AONO, T.; KONDO, K.; MIYOSHI, H.; TANAKA-TAYA, K.; KONDO, M.; OSUGI, Y.; HARA, J.; OKADA, S.; YAMANISHI, K. Monitoring of Human Cytomegalovirus Infections in Pediatric Bone Marrow Transplant Recipients by Nucleic Acid Sequence-Based Amplification. *J Infect Dis.* 178, n. 5, p. 1244-1249, nov. 1998

BAGG, J.; MANNINGS, A.; MUNRO, J.; WALKER, D.M. Rapid diagnosis of oral herpes simplex or zoster virus infections by immunofluorescence: comparison with Tzanck cell preparations and viral culture *Br. Dent. J.*167, n. 7, p. 235-238, Oct. 1989

BARKVOLL, P. & ATTRAMADAL, A. Recurrent herpes labialis in a military brass band *Scand. J. Dent. Res.*95, n. 3, p. 256-258, June 1987

BARRETT, A.P.; BUCKLEY, D.J.; GREENBERG, M.L.; EARL, M.J. The value of exfoliative cytology in the diagnosis of oral herpes simplex infection in immunosuppressed patients *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*62, n. 2, p. 175-178, Aug. 1986

BASSAM, B.J.; CAETANO-ANOLLES, G.; GRESSHOFF, P.M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels *Anal. Biochem.*196, n. 1, p. 80-83, July 1991

BOOM, R.; SOL, C.J.; SALIMANS, M.M.; JANSEN, C.L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M.; VAN DER, N.J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids *J. Clin. Microbiol.*28, n. 3, p. 495-503, Mar. 1990

CHRISTIE, S.N.; MCCAUGHEY, C.; MARLEY, J.J.; COYLE, P.V.; SCOTT, D.A.; LAMEY, P.J. Recrudescence herpes simplex infection mimicking primary herpetic gingivostomatitis *J. Oral Pathol. Med.*27, n. 1, p. 8-10, Jan. 1998

CLEMENTI, M. Quantitative molecular analysis of virus expression and replication *J. Clin. Microbiol.*38, n. 6, p. 2030-2036, June 2000

CONTRERAS, A. & SLOTS, J. Typing of herpes simplex virus from human periodontium *Oral Microbiol. Immunol.*16, n. 1, p. 63-64, Feb. 2001

DALAPATHY, S.; LILY, T.K.; ROY, S.; MADHAVAN, H.N. Development and use of nested polymerase chain reaction (PCR) for the detection of adenovirus from conjunctivitis specimens. *J Clin Virol.* 11, n. 1, p. 77-84, 1998

DE CLEREQ, E. Antiviral drugs: current state of the art. *J. Clin. Virol.* 22, 73-89, 2001.

EPSTEIN, J.B. & STEVENSON-MOORE, P. Dental care of patients who receive head and neck radiation therapy *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*81, n. 5, p. 506-507, May 1996

FABRIS, P.; BIASIN, M.R.; INFANTOLINO, D.; ROMANO, L.; BENEDETTI, P.; TOSITTI, G.; PELLIZZER, G.P.; ZANETTI, A.R.; STECCA, C.; MARCHELLE, G. HGV/GBV-C in liver tissue and in sera from patients with chronic hepatitis C. *Infection.* 26, n. 5, p. 283-7, 1998

FLEMINGTON, E.K. Herpesvirus lytic replication and the cell cycle: arresting new developments *J. Virol.*75, n. 10, p. 4475-4481, May 2001

GALL-TROSELJ, K.; MRAVAK-STIPETIC, M.; JURAK, I.; RAGLAND, W.L.; PAVELIC, J. Helicobacter pylori colonization of tongue mucosa--increased incidence in atrophic glossitis and burning mouth syndrome (BMS) *J. Oral Pathol. Med.*30, n. 9, p. 560-563, Oct. 2001

GOMEZ, R.S.; CARNEIRO, M.A.; SOUZA, L.N.; VICTORIA, J.M.; DE AZEVEDO, W.M.; DE MARCO, L.; KALAPOTHAKIS, E. Oral recurrent human herpes virus infection and bone marrow transplantation survival *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*91, n. 5, p. 552-556, May 2001

GREENBERG, M.S.; BRIGHTMAN, V.J.; SHIP, I.I. Clinical and laboratory differentiation of recurrent intraoral herpes simplex virus infections following fever *J. Dent. Res.*48, n. 3, p. 385-391, May 1969

HAMPRECHT, K.; STEINMASSL, M.; EINSELE, H.; JAHN, G. Discordant detection of human cytomegalovirus DNA from peripheral blood mononuclear cells, granulocytes and plasma: correlation to viremia and HCMV infection. *J. Clin. Virol.* 11, n. 2, p. 125-36, Aug. 1998

HANN, I.M.; PRENTICE, H.G.; BLACKLOCK, H.A.; ROSS, M.G.; BRIGDEN, D.; ROSLING, A.E.; BURKE, C.; CRAWFORD, D.H.; BRUMFITT, W.; HOFFBRAND, A.V. Acyclovir prophylaxis against herpes virus infections in severely immunocompromised patients: randomised double blind trial *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed)*287, n. 6389, p. 384-388, Aug. 1983

HARDMAN J.G.; LIMBIRD L.E.; MOLINOFF P.B.; RUDDON R.W.; GOODMAN G.A. GOODMAN & GILMAN: As bases farmacológicas da terapêutica. 9 ed. Alameda: Mcgraw-Hill interamericana. 1996

HEDNER, E.; VAHLIN, A.; BERGSTROM, T.; HIRSCH, J.M. Recrudescence of herpes simplex virus type 1 in latently infected rats after trauma to oral tissues. *J Oral Pathol Med.* 22, p. 214-20, May. 1993a

HEDNER, E.; VAHLIN, A.; HIRSCH, J.M. Primary herpes simplex virus (type 1) infection delays healing of oral excisional and extraction wounds in the rat. *J Oral Pathol Med.* 19, p. 471-6, 1990

HEDNER, E.; VAHLIN, A.; KAHNBERG, K.E.; HIRSCH, J.M. Reactivated herpes simplex virus infection as a possible cause of dry socket after tooth extraction. *J Maxillofac Surg.* 51, n.4, p. 370-6, Apr. 1993b

KAMEYAMA, T.; SUJAKU, C.; YAMAMOTO, S.; HWANG, C.B.; SHILLITOE, E.J. Shedding of herpes simplex virus type 1 into saliva *J. Oral Pathol.* 17, n. 9-10, p. 478-481, Nov. 1988

KNAUP, B.; SCHUNEMANN, S.; WOLFF, M.H. Subclinical reactivation of herpes simplex virus type 1 in the oral cavity *Oral Microbiol. Immunol.* 15, n. 5, p. 281-283, Oct. 2000

LAMEY P.J.; LEWIS M.A.O. Viral infection. *A clinical Guide to oral medicine.* 19, n., 1997

LEWIS, M.A. O.; Herpes simplex virus: an occupational hazard in dentistry. *Int. Dental J.* 54, n. , p. 103-111, 2004

LLORENTE, J.L.; HIDALGO, F.I.; MELON, S.; DE ONA, M.; CARRENO, M.; SUAREZ, C. Detection of herpes simplex virus-1 by nested PCR. An experimental model *Auris Nasus Larynx* 25, n. 4, p. 387-392, Dec. 1998

LOGAN, H.L.; LUTGENDORF S.; HARTWIG A.; BERBERICH S.L.; Immune, stress, and mood markers related to recurrent oral herpes outbreaks. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 86, n. 1, p. 48-54, July 1998

MOGENSEN, T.H. & PALUDAN, S.R. Molecular pathways in virus-induced cytokine production *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, n. 1, p. 131-150, Mar. 2001

NEVILLE B.W.; DAMM D.D.; ALLEN C.M.; BOUQUOT J.E. *Patologia Oral & Maxilofacial.* 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. cap. 7, p. 205-12, 2004

NISENGARD RJ & NEWMAN MG. *Microbiologia oral e Imunologia.* 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap. 395, 1994

OAKLEY, C.; EPSTEIN, J.B.; SHERLOCK, C.H. Reactivation of oral herpes simplex virus: implications for clinical management of herpes simplex virus recurrence during radiotherapy. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 84, n. 3, p. 272-278, Sept. 1997

PALLASCH T.J.; JOSEPH C.E.; GILL C.J. Aciclovir and herpes virus infections. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 57, n. 1, p. 41-4, Jan. 1984

PINA, S.; JOFRE, J.; EMERSON, S.U.; PURCELL, R.H.; GIRONES, R. Characterization of a Strain of Infectious Hepatitis E Virus Isolated from Sewage in an Area where Hepatitis E Is Not Endemic. *Appl Environ Microbiol.* 64, n.11, p. 4485-4488, 1998

ROBINSON, P.A.; HIGH, A.S.; HUME, W.J. Rapid detection of human herpes simplex virus type 1 in saliva *Arch. Oral Biol.*37, n. 10, p. 797-806, Oct. 1992

ROIZMAN, B. & WHITLEY, R.J. The nine ages of herpes simplex virus *Herpes.*8, n. 1, p. 23-27, Mar. 2001

SCOTT, D.A.; COULTER, W.A.; BIAGIONI, P.A.; O'NEILL, H.O.; LAMEY, P.J. Detection of herpes simplex virus type 1 shedding in the oral cavity by polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay at the prodromal stage of recrudescence of herpes labialis *J. Oral Pathol. Med.*26, n. 7, p. 305-309, Aug. 1997a

SCOTT, D.A.; COULTER, W.A.; LAMEY, P.J. Oral shedding of herpes simplex virus type 1: a review *J. Oral Pathol. Med.*26, n. 10, p. 441-447, Nov. 1997b

SCULLY, C. Orofacial herpes simplex virus infections: current concepts in the epidemiology, pathogenesis, and treatment, and disorders in which the virus may be implicated *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*68, n. 6, p. 701-710, Dec. 1989

SILVA, L.M.; GUIMARÃES, A.L.S.; VICTÓRIA, J.M.N.; GOMES C.C.; GOMEZ R.S.; Herpes simplex virus type I shedding in the oral cavity of seropositive patients. *Oral Diseases.*11, p. 13-16, 2005.

SILVA, L.M.; GUIMARÃES, A.L.S.; SANTORO, L.C.; GOMEZ R.S.; The Human Herpes virus-1: a literature review. *Arquivos em Odontologia.*38, n. 3, p. 167-178, Jul/Set 2002

SONG, B.; LIU, J.J.; YEH, K.C.; KNIPE, D.M. Herpes simplex virus infection blocks events in the G1 phase of the cell cycle *Virology.* 267, n. 2, p. 326-334, Feb. 2000

TATEISHI, K.; TOH, Y.; MINAGAWA, H.; TASHIRO, H. Detection of herpes simplex virus (HSV) in the saliva from 1,000 oral surgery outpatients by the

polymerase chain reaction (PCR) and virus isolation *J. Oral Pathol. Med.* 23, n. 2, p. 80-84, Feb. 1994

VICTÓRIA, J.M.N.; GUIMARÃES, A.L.S.; SILVA, L.M.; KALAPOTHAKIS, E.; GOMEZ, R.S. Polymerase chain reaction for identification of herpes simplex virus (HSV-1), cytomegalovirus (CMV) and human herpes virus-type 6 (HHV-6) in oral swabs. *Microbiol. Research* 160, p. 61-65, 2005.

WEIR J.P. Regulation of herpes simplex virus gene expression. *Gene* v. 271, n. 2, p. 117-130, Jun. 2001

WHITLEY R.J.; DAVID W.K.; ROIZMAN B. Herpes simplex viruses. *Clinical Infection Diseases*. 26. p. 541-55, 1998

WHITLEY, R.J. Herpes simplex virus infection *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* 13, n. 1, p. 6-11, Jan. 2002

WILLIAMSON, R. T. Diagnosis and management of recurrent herpes simplex induced by fixed prosthodontic tissue management: A clinical report. *J Prosthetic Dentistry*. 82, p. 1-2, 1999

WOO, S.B. & LEE, S.F. Oral recrudescence of herpes simplex virus infection. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 83, n. 2, p. 239-243, Feb. 1997

YURA, Y. et al. Mental nerve neuropathy as a result of primary herpes simplex virus infection in the oral cavity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 90, p. 306-9, 2000

ANEXOS

ANEXO-A- SEQUÊNCIA DO DNA - HSV-1

ORIGEM: Gene da glicoproteína B

ACESSO: K01760

OBS: A figura representa somente a seqüência onde estão localizados os primers.

```
2401 ggagaacaac gagctgcggc tgacgcgcga tgcgatcgag ccgtgcaccg tgggacaccg
2461 gcgctacttc accttcgggtg ggggctacgt gtacttcgag gagtacgcgt actcccacca
2521 gctgagccgc gccgacatca ccaccgtcag caccttcacg gacctcaaca tcaccatgct
2581 ggaggatcac gagtttgtcc ccttggaggt gtacaccgcg cacgagatca aggacagcgg
2641 cctgctggac tacacggagg tccagcgcgc caaccagctg cacgacctgc gcttcgccga
2701 catcgacacg gtcatccacg ccgacgccaa cgccgccatg ttcgcggggc tgggcgcggt
2761 cttcgagggg atgggcgacc tggggcgcgc ggtcggcaag gtggtgatgg gcatcgtggg
2821 cggcgtggta tcggccgtgt cgggcgtgtc ctcccttcacg tccaaccctt ttggggcgct
2881 ggccgtgggt ctggttggtc tggccggcct ggcggcggcc ttcttcgctt ttcggtacgt
2941 catgcggctg cagagcaacc ccatgaaggc cctgtaccct ctaaccacca aggagctcaa
3001 gaaccccacc aaccgggacg cgtccgggga gggcgaggag ggcggcgact ttgacgaggg
3061 caagctagcc gaggccaggg agatgatacg gtacatggcc ctggtgtcgg ccatggagcg
3121 cacggaacac aaggccaaga agaagggcac gagcgcgctg ctcagcgccca aggtcaccga
3181 catggtcatg cgcaagcgcg gcaacaccaa ctacacccaa gttcccaaca aagacggtga
3241 cgccgacgag gacgacctgt gacgggggggt ttggttgtaa taaaaaccac ggggtgttaa
3301 ccgcatgcgc atcttttgggt ttttttgggt ggtcagcctt ttgtgtgtgt gtgggaagaa
```

PCR específico para herpes 1- Iniciadores utilizados (Externos):

M 5' TGC TGG AGG ATC ACG AGT TTG 3'

F- (2577 – 2597) Tm: 55.0°C

N 5' CAT CGT CTT TGT TGG GAA CTT 3'

R- (3239 – 3218) Tm: 55.9°C

Produto de PCR 663 pb

Temperatura de anelamento: 61.6°C

PCR específico para herpes 1- Iniciadores utilizados (Internos):

O 5' TGC AGA GCA ACC CCA TGA AG 3'

F- (2949-2968) Tm: 55.9°C

P 5' ATG ACC ATG TCG GTG ACC TTG G 3'

R- (3189-3168) Tm: 58.2°C

Produto de PCR 241 pb

Temperatura de anelamento: 60.1°C A localização dos iniciadores no DNA está indicada com a seqüência destacada em vermelho

ANEXO-B- SOLUÇÕES UTILIZADAS NA EXTRAÇÃO DO DNA

Solução de Krebs

	100 ml (qsp H ₂ O)	300 ml (qsp H ₂ O)
NaCl 20%	3,5 ml	10,5 ml
KCl 2%	1,7 ml	5,1 ml
CaCl ₂ 2H ₂ O 2%	1,76 ml	5,7 ml
MgSO ₄ 7H ₂ O 2%	1,45 ml	4,35 ml
KH ₂ PO ₄ 2%	1,00 ml	3 ml
NaHCO ₃ 2%	10 ml	30 ml
C ₆ H ₁₂ O ₆	0,2 g	0,6 g
Eserina 10 ⁻³ M	1 ml	3 ml

Extração do DNA

Sílica: SiO₂ 60 g

H₂O qsp 500 ml

Preparo da sílica (SC)

- Ressuspender em cilindro graduado $\phi=5$ cm; alt. 27,5 cm (col. H₂O)
- Sedimentar por 24 hs; TA
- Descartar o sobrenadante e adicionar H₂O qsp 500 ml. Ressuspender o sedimento.
- Deixar a TA por 5 hs. E descartar o sobrenadante.
- Adicionar a suspensão 600 μ l para ajustar o pH para 2.0.
- Aliquotar e autoclavar. A suspensão é estável por no mínimo 6 meses.

Tampão de lise (L6)

GuSCN 97g

Tris HCl 0,1 M pH 6.4 100ml
EDTA 0,2M pH 8.0 22ml
Triton X-100 2,45 ml

Tampão de lavagem (L2)

Cloridrato de guanidina 97g
Tris HCl 0,1M pH 6.4 100ml

Obs: L2 e L6 devem ser estocados ao abrigo de luz, por um período máximo de 15 dias.

Etanol 70%

- 1º) Medir o volume de etanol absoluto, de acordo com o volume a ser preparado;
- 2º) Completar o volume final com água destilada;
- 3º) Homogeneizar;
- 4º) Pode-se conservar o etanol 70% a temperatura ambiente, a 4°C ou a 20°C, o que dependerá da sua utilização.

Acetona 100%

Utilizar acetona de qualidade compatível com processos de Biologia Molecular

Tampão TE

1º) Preparar as seguintes soluções :

- Tris-HCl 1 M pH 8.0

- EDTA 0,5 M pH 8.0

2º) Unir em um único recipiente as soluções acima citadas, nas seguintes concentrações, de acordo com o volume a ser preparado:

- Tris-HCl 10mM pH 8.0
- EDTA 1mM pH 8.0

3º) Completar o volume final com água milli-Q;

4º) Homogeneizar;

5º) Autoclavar;

6º) Conservar a temperatura ambiente.

ANEXO-C- SOLUÇÕES UTILIZADAS NA ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

EDTA 0,5 M

EDTA 18,61g

H₂O qsp 1000ml

Acertar pH para 7,5 com NaOH

Tampão Tris-acetato (TAE) 50X

Tris base 242,0g

Ácido acético glacial 57,1ml

EDTA 0,5M Ph 8,0 100ml

H₂O qsp 1000ml

TAE 1x

TAE 50X 40ml

H₂O qsp 2000ml

Gel de agarose 1,5%

Agarose 1,5g

TAE 1X qsp 100ml

Tampão de amostra 6x

Azul de bromofenol 0,025g

Glicerol 3ml

H₂O MILLI Q qsp 10ml

Brometo de Etídio 0,3 µg/ml

Brometo de Etídio 10 mg/ml

6,0 µl

H₂O qsp

200 ml

ANEXO-D- SOLUÇÕES UTILIZADAS NA ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 6,5%

Acrilamida 30%

Para cada 100mL de solução:

- | | |
|--------------------|--------------|
| - Acrilamida | 29g |
| - Bis-acrilamida | 1g |
| - H ₂ O | q.s.p. 100ml |

TBE 20X

- | | |
|---------------------------|--------|
| - Tris | 121g |
| - Ácido bórico | 61,7g |
| - EDTA | 7,44g |
| - H ₂ O q.s.p. | 1000ml |

TBE 10X

- | | |
|---------------------------|--------|
| - TBE 20X | 500ml |
| - H ₂ O q.s.p. | 1000ml |

TBE 1X

- | | |
|---------------------------|--------|
| - TBE 50X | 50ml |
| - H ₂ O q.s.p. | 1000ml |

Confecção do gel de poliacrilamida

- Lavar as placas de vidro com éter, álcool isopropílico e álcool 70%;
- Adicionar em um Béquer;

o Acrilamida 30%	1,079ml
o TBE 10X	0,65ml
o Água destilada	3,22ml
o TEMED	4,00 μ l
o APS	40,00 μ l

Soluções utilizadas na coloração do gel de poliacrilamida pela Prata

Solução de Prata

Nitrato de Prata 40%	4,00ml
Formaldeído 37%	75 μ l
Água destilada q.s.p.	50ml

Solução Reveladora

Carbonato de Sódio	1,5g
Formaldeído 37%	75 μ l
Tiosulfato de Sódio	20 μ l
Água destilada q.s.p.	50ml

Ácido Acético 10%

Para cada 5 l de solução

Ácido acético glacial	500ml
H2O destilada q.s.p.	5 l

ANEXO -E- COMPROVANTE DO COMITÊ DE ÉTICA

ANEXO -F- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO PACIENTE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

DEPARTAMENTO DE CLÍNICA, PATOLOGIA E CIRURGIA ODONTOLÓGICAS

Belo Horizonte, ____ de _____ de 20____.

Prezado paciente,

Esse documento tem como finalidade propor a sua participação no projeto de pesquisa “Análise Da Reativação Do Vírus Herpes Simples Tipo 1 Após Procedimentos Odontológicos Pela Técnica Da PCR”, este projeto de pesquisa tem como objetivo, verificar a reativação do vírus do herpes simples tipo 1 em raspado intra-bucal de pessoas que serão submetidas a procedimentos odontológicos. Gostaríamos de contar com a sua colaboração, esclarecendo que:

- 1- A pesquisa consiste na coleta de dois raspados intra-bucal, antes e depois do procedimento odontológico estabelecido.
- 2- O paciente também será submetido à coleta de Três mL de sangue por via endovenosa para verificação de sorologia para HSV-1.

- 3- Somente será coletado o material de pacientes que assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido e que forem atendidos na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (FO-UFMG).
- 4- Os benefícios estão baseados no fato de que este trabalho pode ajudar a uma melhor compreensão do processo de desenvolvimento da doença. O projeto em si não leva a riscos ao paciente, visto que independente de participarem ou não do estudo, todos os pacientes irão ser submetidos ao tratamento odontológico.
- 5- Todos os pacientes, incluindo os que não quiserem participar do trabalho serão devidamente atendidos e tratados na FO-UFMG.
- 6- Todos os seus dados serão confidenciais, sua identidade não será revelada publicamente, em hipótese alguma e somente os pesquisadores envolvidos neste projeto terão acesso a estas informações, que serão utilizadas somente para fins de pesquisa.
- 7- Essa pesquisa tem aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP). Qualquer dúvida entre em contato com o COEP, no telefone (31) 3248-9364.
- 8- Não será prevista qualquer forma de remuneração para o voluntário e todas as despesas relacionadas com o estudo são de responsabilidade do pesquisador e do professor orientador.
- 9- Todos os participantes poderão, a qualquer momento, desistir de fazer parte dessa pesquisa.

Desde já, agradecemos sua colaboração.

- Luciano Marques da Silva (Mestrando em Estomatologia)

End. R. Dirceu Lopes, 456 - B. Centro

Pedro Leopoldo, MG – Cep 33.600-000

Tel.: (31) 3661-1906/ (31) 9208-1967

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____

autorizo a minha participação no trabalho intitulado “Análise Da Reativação Do Vírus Herpes Simplex tipo 1 Após Procedimentos Odontológicos Pela Técnica Da PCR”, que faz parte do projeto de pesquisa do aluno Luciano Marques da Silva, Mestrando em Estomatologia do Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Afirmando que fui devidamente esclarecido(a) quanto aos objetivos da pesquisa, quanto ao caráter confidencial dos dados e quanto ao destino do material coletado (caráter científico), e que em qualquer momento posso retirar esse consentimento.

(Assinatura do paciente ou responsável)

Documento de Identidade: _____

ANEXO -G- TERMO DE COMPROMISSO DO PESQUISADOR

TERMO DE COMPROMISSO DO PESQUISADOR

EU, LUCIANO MARQUES DA SILVA, MESTRANDO EM ESTOMATOLOGIA PELA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, ASSUMO POR MEIO DESTE INSTRUMENTO, NO QUE SE REFERE AOS ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS, OBEDECER AO EXIGIDO PELA LEGISLAÇÃO BRASILEIRA, CONFORME AS RESOLUÇÕES CNS Nº 196/96 E 304/00 DO CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE, SOBRE DIRETRIZES E NORMAS REGULAMENTADORAS DE PESQUISAS ENVOLVENDO SERES HUMANOS, DURANTE A PESQUISA INTITULADA: “ANÁLISE DA REATIVAÇÃO DO VÍRUS HERPES SIMPLES APÓS PROCEDIMENTOS ODONTOLÓGICOS PELA TÉCNICA DA PCR”, O QUAL SERÁ REALIZADO ATRAVÉS DA COLETA DE DOIS RASPADOS INTRA-BUCAIS ANTES E DEPOIS DO PROCEDIMENTO ODONTOLÓGICO EFETUADO NA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS .

BELO HORIZONTE, 07 DE MARÇO DE 2004.

LUCIANO MARQUES DA SILVA

ANEXO -H- FICHA CLÍNICA DO PACIENTE

FICHA CLÍNICA

Caso n°: _____

Data de inclusão: ___/___/___

NOME: _____

Sexo: M() F()

Data de Nascimento: ___/___/___ Idade: _____

Naturalidade:

Grau de Escolaridade: _____

Analfabeto = 1 I grau incompleto = 2 I grau completo = 3

II grau incompleto = 4 II grau completo = 5

III grau incompleto = 6 III grau completo = 7

Profissão: _____

Renda Familiar (em salários mínimos vigentes no país):

1 salário mínimo = R\$ _____ U\$ _____

Doenças pré-existentes (sim ou não)

- anemia
- diabetes
- AIDS
- Outros
- História de herpes bucal ou genital?

1- Quando ocorreu a manifestação primária?

2- Como se apresentou a manifestação primária?

3- Quando ocorreu a primeira manifestação de recorrência?

4- Você tem com frequência recorrências? Quantas ao ano?

5- Outras pessoas da família apresentam HSV I?

6- Quais são os fatores predisponentes relacionados com as recorrências?

7- Você utiliza algum medicamento para controle do herpes? Qual? Qual o resultado?

8- Quais os sintomas mais comuns das recorrências?

Observações: