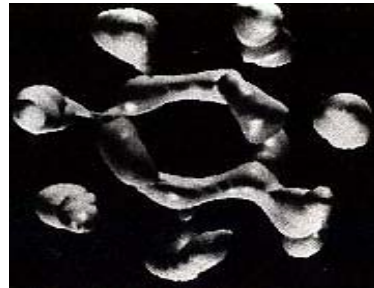
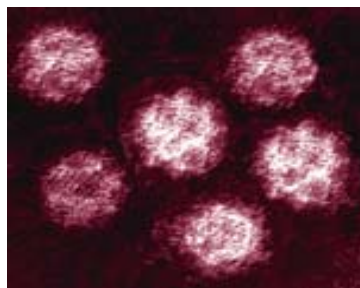


SORAIA ALMEIDA WATANABE IMANISHI

A INVESTIGAÇÃO DO  
CITOMEGALOVÍRUS E DO EPSTEIN-  
BARR VÍRUS NA DOENÇA  
PERIODONTAL HUMANA.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

BELO HORIZONTE – MINAS GERAIS

2005

SORAIA ALMEIDA WATANABE IMANISHI

A INVESTIGAÇÃO DO CITOMEGALOVIRUS E  
DO EPSTEIN-BARR VÍRUS NA DOENÇA  
PERIODONTAL HUMANA.

(Fotomicrografia do HCMV / Fotomicrografia EBV por Linda Stannard - Cape Town)

Dissertação apresentada ao programa do  
Colegiado de Pós-Graduação da  
Faculdade de Odontologia da  
Universidade Federal de Minas Gerais,  
como requisito parcial para a obtenção do  
grau de Mestre em Odontologia, Área de  
concentração: Periodontia.

Orientador: José Eustáquio da Costa

Co-orientador: Ricardo Santiago Gomez

**BELO HORIZONTE – MINAS GERAIS**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

**2005**

A INVESTIGAÇÃO DO CITOMEGALOVÍRUS E DO  
EPSTEIN-BARR VÍRUS NA DOENÇA  
PERIODONTAL HUMANA.

Dissertação apresentada ao programa do  
Colegiado de Pós-Graduação da  
Faculdade de Odontologia da  
Universidade Federal de Minas Gerais,  
como requisito parcial para a obtenção do  
grau de Mestre em Odontologia, Área de  
concentração: Periodontia.

Orientador: José Eustáquio da Costa

Co-orientador: Ricardo Santiago Gomez

Este projeto teve apoio financeiro do CNPq

*Dedico esta dissertação  
àquela em quem pude confiar,  
com quem pude desabafar;  
àquela que sofreu junto e  
sustentou todo o meu amadurecimento...*

*Falar sobre você  
É falar sobre coragem  
Humildade,  
Espiritualidade...*

*Se eu conseguir passar para o Arthur  
que seja um pouquinho de tanta dignidade...  
Tenho certeza que eu terei cumprido o meu papel...*

*Dedico esta dissertação  
à maior das mulheres;  
Dedico todo o meu trabalho  
à minha mãe.*

## AGRADECIMENTOS

**Aos meus pais- Antônio e Cristina-** por terem oferecido real apoio para a conclusão do Mestrado, se eu cheguei até aqui foi graças a vocês...

**Às minhas tias - Zena e Neusa- e à minha irmã – Gisele-** que foram babás mais que perfeitas durante as aulas e a escrita desta dissertação.

**Ao meu marido – Luis -** pela sua espera (!), seu apoio e pelo seu constante amadurecimento .

**Ao meu filho – Arthur -** que desde muito pequenino conviveu com a ausência da mamãe e que em muitas vezes, foi consolado com mamadeiras. *“Sempre ao teu lado estarei, quando precisar.. pensando em ti eu vou sempre estar... Cada passo de tua vida, vou te acompanhar... você enche os meus dias de alegria...”*

Agradeço a você, meu bebê, por ser desde o início, uma pessoa iluminada e por ter realmente mudado a minha vida.

**Ao meu orientador- José Eustáquio-** pela paciência, compreensão e sabedoria de um mestre. Suas palavras tiveram realmente um poder transformador na minha profissão.

**Ao meu co-orientador- Ricardo Gomez -** por toda a colaboração, apoio e por ter “aberto as portas” do Laboratório de Patologia da FO-UFMG.

**À minha tutora na Patologia - Jeane de Fátima Correia Silva -** por ter me guiado pacientemente nas técnicas da biologia molecular e que na minha ausência tomou as rédeas dos exames no laboratório.

**Ao amigo Martinho Campolina** que se dispôs à árdua tarefa de realizar as análises estatísticas.

**Aos colegas do laboratório de Patologia da FO - UFMG** (Eliza, André, Flávio, Júnia, Carolina e Alessandra) que gentilmente acolheram uma mestrandia que não era da mesma área de concentração.

**Às meninas da secretaria do colegiado de pós-graduação-**Vanessa, Janete, Helena, Beth e Sarah - que com a maior força de vontade se puseram à disposição durante todo o curso.

**À colega e doutoranda Paula Rocha** que me iniciou nas técnicas laboratoriais no ICB- UFMG.

**Às amigas Fernanda, Kátia, Flávia, Ana Lima e Ana Gomez** por terem mais uma vez provado serem realmente amigas, incondicionais.

**Ao Professor Fernando Oliveira Costa** pela sua disposição e preciosa colaboração em todas as fases deste trabalho.

**Ao aluno de Iniciação científica Marcos** que ajudou na literatura consultada.

**À professora Isabela Almeida Pordeus** como coordenadora do Colegiado de pós - graduação pela imensa ajuda, desde a graduação.

**À colega e doutoranda Paôlla Perdigão** pela boa vontade e grande contribuição na metodologia deste trabalho.

**Ao colega de Mestrado Sérgio Ferreira** pela amizade e coleguismo durante o curso.

**Ao grande Paulo Eduardo Alencar de Souza** pela sua imensa e valiosa colaboração na Pré -Defesa.

**Ao professor Saul Martins de Paiva** pela sua ajuda nas atividades científicas desde a graduação.

**Aos pacientes** que gentilmente concordaram em participar deste estudo.

## RESUMO

Nos últimos anos, um número crescente de estudos sugere a participação dos vírus Epstein Barr (EBV) e Citomegalovírus (HCMV) na doença periodontal, sabidamente uma doença provocada por bactérias. Este trabalho investiga a relação entre a infecção por HCMV e EBV-1 e a doença periodontal humana, comparando a frequência desses vírus nos sítios periodontais com gengivite e nos sítios com profundidade de sondagem aumentada. Hipotetizamos que haja uma associação entre a presença do vírus e a perda de inserção. Após a aprovação do COEP e termos de consentimentos assinados, foram colhidas as amostras do fluido crevicular de 30 pacientes portadores de periodontite agressiva. A coleta consistiu de sondagem dos sítios para posterior inserção de um cone de papel absorvente ao longo do sulco. Cada paciente foi submetido a 2 coletas de sítios com gengivite e outras duas de sítios com periodontite. Para detecção dos dois vírus foi realizada a técnica de PCR separadamente para cada vírus. Duas amostras (1,67%) foram positivas para o HCMV e 53 (44,2%) delas, positivas para o EBV-1. Somente um sítio exibiu infecção mista pelos dois vírus testados. Através do teste de Mc Nemar, houve diferença na ocorrência de EBV-1 entre os sítios com gengivite e os sítios com periodontite, tendo ocorrido maior número de casos EBV-1 + nos sítios com periodontite. Não foi constatada diferença estatística significativa para o HCMV entre os dois grupos. Quando a unidade é paciente, o EBV-1 foi o vírus mais prevalente, ocorrendo em 77% dos indivíduos pesquisados. A presença de EBV-1 com maior frequência nos sítios com profundidade de sondagem aumentada sugere uma associação positiva desse vírus com as lesões de periodontite agressiva.

**PALAVRAS-CHAVE:** patogênese, periodontite, EBV, HCMV, vírus.



## LISTA DE ABREVIATURAS

<i>Aa</i>	–	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>
<i>B. forsythus</i>	–	<i>Bacteroides forsythus</i>
$\beta$ -globin	-	Beta-globin
DNA	–	Ácido desoxirribonucleico
EBV	-	Epstein –Barr vírus
HCMV	-	Citomegalovírus
HHV	-	Herpes vírus humano
HIV	-	Vírus da Imunodeficiência humana
HSV	-	Vírus herpes simples
IFN- $\gamma$	-	Interferon - gama
IL –2	–	Interleucina 2
IL-10	–	Interleucina 10
MHC	–	Complexo de histocompatibilidade maior
<i>P. gingivalis</i>	–	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>P. intermedia</i>	–	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>P. nigrescens</i>	-	<i>Prevotella nigrescens</i>
PJL	-	Periodontite Juvenil Localizada
<i>Taq</i> DNA polimerase	-	<i>Thermus aquaticus</i> DNA polimerase
<i>T. denticola</i>	-	<i>Treponema denticola</i>
<i>T. forsythia</i>	-	<i>Tanerella forsythia</i>
TNF – $\alpha$	–	Fator de necrose tumoral alfa

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Modelo para a periodontite relacionada ao herpesvírus.-----	24
Figura 2	- Fluxograma explicativo da metodologia empregada. -----	41
Figura 3	- Reação da PCR para detecção do HCMV -----	55
Figura 4	- Reação da PCR para detecção do EBV-1-----	55
Gráfico 1	- Frequências relativas quanto à distribuição dos gêneros da população estudada.-----	52
Gráfico 2	- Frequências relativas quanto à distribuição da idade da população estudada. -----	53
Gráfico 3	- Frequências relativas da condição de tratamento da população estudada -----	53
Gráfico 4	- Frequência dos vírus HCMV e EBV na população estudada unidade sítio -----	57
Gráfico 5	- Frequência dos vírus HCMV e EBV na população estudada unidade paciente -----	57
Quadro 1	- Condições da PCR para o HCMV -----	45
Quadro 2	- Condições da PCR para o EBV-1 -----	46
Quadro 3	- Condições da PCR para a $\beta$ -globina-----	46
Quadro 4	- Iniciadores para o gene da $\beta$ -globina-----	48
Quadro 5	- Cronograma da PCR: total de 480 reações feitas nesta investigação -----	49
Quadro 6	- Soluções para revelar o gel de poliacrilamida a 6,5%-----	50
Quadro 7	- Bandas fornecidas pelo padrão de peso molecular usado na Eletroforese -----	54

## LISTA DE TABELAS

1 - Frequência dos vírus EBV-1 e HCMV na população estudada -----	56
2 - Teste do Qui- quadrado para a frequência do EBV-1 -----	58
3 - Teste de McNemar realizado considerando pacientes positivos e negativos para o EBV-1 -----	59
4- Distribuição das amostras positivas e negativas para o EBV-1 segundo o gênero dos pacientes -----	60
5 - Distribuição das amostras positivas e negativas para o EBV-1 segundo a idade dos pacientes -----	61
6 - Distribuição das amostras positivas e negativas para o EBV-1 segundo a condição de tratamento periodontal dos pacientes -----	62
7 - Teste de McNemar realizado considerando pacientes positivos e negativos para o HCMV -----	63
8 - Teste do Qui-quadrado para a frequência do HCMV -----	64
9 - Distribuição das amostras positivas e negativas para o HCMV segundo o gênero dos pacientes -----	64
10 - Distribuição das amostras positivas e negativas para o HCMV segundo a idade dos pacientes -----	65
11 - Distribuição das amostras positivas e negativas para o HCMV segundo a condição de tratamento periodontal dos pacientes -----	66

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	
2.1	Mecanismos patogênicos de infecção viral	16
2.2	O papel do vírus herpes na doença periodontal	26
3	OBJETIVOS	
3.1	Geral	38
3.2	Específicos	38
4	HIPÓTESES	39
5	METODOLOGIA	
5.1	Desenho de estudo	40
5.2	Amostra e unidade amostral	40
5.3	Considerações éticas	42
5.4	Protocolo para a obtenção dos dados	42
5.4.1	Exame clínico periodontal e coleta do material para análise	42
5.4.2	Teste piloto	43
5.4.3	Preparo do material coletado e extração de DNA	43
5.4.4	Examinador	44
5.5	Reação em cadeia da polimerase	44
5.6	Visualização dos resultados em gel	49
5.7	Análise estatística	50
5.7.1	Testes estatísticos	51
6	RESULTADOS	
6.1	Caracterização da amostra	52
6.2	Resultados da PCR	54
6.3	EBV-1 e doença periodontal	58
6.4	HCMV e doença periodontal	63
7	DISCUSSÃO	67
8	CONCLUSÕES	74
	REFERÊNCIAS	
	APÊNDICES	
	APÊNDICE 1 Termo de consentimento livre e esclarecido	

## APÊNDICE 2 Biologia molecular

- A - Seqüência do DNA – HCMV
- B - Soluções utilizadas na extração do DNA
- C - Soluções utilizadas na eletroforese em gel de agarose
- D- Soluções utilizadas na eletroforese em gel de poliacrilamida 6,5%
- E- Soluções utilizadas na coloração do gel de poliacrilamida pela prata

## APÊNDICE 3 Protocolo de aprovação do COEP

## 1 INTRODUÇÃO

A placa dental é o fator essencial para o estabelecimento da gengivite e periodontite. Segundo Lindhe (2000), “a placa é um depósito microbiano de ocorrência natural representando um biofilme verdadeiro que consiste em bactérias em uma matriz composta de polímeros extracelulares de origem bacteriana e produtos do exsudato do sulco e/ou da saliva.” De acordo com conhecimentos mais recentes também podemos identificar antígenos virais também no biofilme.

A patogênese da doença periodontal inclui interações dinâmicas entre os vários agentes infecciosos e a resposta imune do hospedeiro. No entanto, apesar de uma extensa literatura evidenciar o papel primário das bactérias na periodontite, o biofilme subgengival por si só é insuficiente para explicar a variabilidade das apresentações clínicas da doença. A infecção bacteriana sozinha não explica o padrão agressivo de destruição tecidual em dentes com pouca placa, as fases de atividade/ remissão da doença e a tendência da destruição periodontal se apresentar numa forma localizada e bilateralmente simétrica. Tampouco explica a existência de pacientes com fatores de risco clássicos exibindo apenas um quadro de gengivite. Nesse contexto, têm se procurado outros fatores que atuem junto com o sistema imune do hospedeiro que alterem o curso da doença periodontal.

Alguns estudos têm associado tipos virais à etiopatogênese da periodontite. Esta associação não é inédita na Odontologia. Há alguns anos os vírus têm sido associados à etiologia de muitas doenças orais. Muitas destas associações se baseiam nos DNA vírus, especialmente os vírus do herpes que já foram relacionados, por exemplo, com alguns casos de eritema multiforme e leucoplasia pilosa (GREENSPAN & GREENSPAN, 1989). O papiloma-vírus foi associado a lesões papilomatosas (GREENSPAN et al., 1988 COSTA et al., 1994), hiperplasia epitelial focal (SYRJANEN et al., 1984; GARLICK et al., 1989; HENKE et al.,

1989; PADAYACHEE & VAN WYK, 1991; CARLOS & SEDANO, 1994; COSTA et al., 1994; JIMENEZ et al., 2001;) e a carcinomas (SYRJANEN et al., 1984; MAO & SMITH, 1993; YADAV et al., 1997; D' COSTA et al., 1998; TSUHAKO et al., 2000; JANG et al., 2001; HIGA et al., 2002). Os vírus também podem estar envolvidos na etiopatogenia das aftas (HOOKS, 1978) e da Síndrome de Behçet (HOOKS, 1978). Mais recentemente foram associados a periapicopatias sintomáticas (SLOTS et al., 2004)

A doença periodontal é um processo patológico cuja etiopatogenia ainda permanece obscura sob os olhos da ciência. Nas últimas décadas, muitos estudos afirmaram a importância de tipos microbianos específicos na doença periodontal. Tais pesquisas se voltaram para bactérias e, em menor extensão para fungos e parasitas (SLOTS & PARRA, 1996). Pouca ou nenhuma consideração foi dada a um possível envolvimento de vírus humanos na etiologia e patogênese desta doença destrutiva. No entanto, pôde-se observar nos últimos anos, um número crescente de estudos sugerindo que alguns tipos de vírus constituem uma importante fonte para a causa da destruição dos tecidos periodontais (SLOTS, 2002).

Diferentes metodologias têm sido utilizadas nestas avaliações. No presente estudo, realizamos uma análise comparativa da frequência do Epstein-Barr vírus (EBV) e do citomegalovírus (HCMV) em sítios com gengivite e periodontite de um mesmo paciente.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Mecanismos patogênicos de infecção viral

A característica marcante da infecção por herpesvírus é a debilidade que ele traz ao sistema imune do hospedeiro, suprimindo a imunidade mediada por células e alterando a função e/ou número dos linfócitos B. Oito espécies de herpesvírus que infectam humanos já foram identificadas:

- HSV – herpes simples vírus tipo 1 e 2 (HHV-1 E HHV-2)
- VZV - varicella-zoster vírus (HHV-3)
- EBV – Epstein-Barr vírus Tipo 1 e 2 (EBV-1 e EBV-2)
- HCMV – citomegalovírus humano (HHV-5)
- HHV-6 – herpesvírus tipo 6
- HHV-7 – herpesvírus tipo 7
- HHV-8 – herpesvírus tipo 8 (Sarcoma de Kaposi) (ROIZMAN,1996)

“Herpesvírus são os vírus mais ubíquos, transmissíveis e infecciosos em humanos. O vírus do herpes é envelopado, possui DNA de fita dupla e nucleocapsídeo icosaédrico, .. replicando – se no núcleo da célula.” (PARK, 1997, p.224). Todos os vírus da família Herpes possuem algumas características comuns. Todos eles possuem DNA, causam infecção primária no primeiro contato e tornam-se latentes dentro do núcleo de células específicas durante toda a vida do indivíduo infectado. O HCMV pertencendo a esta família, tem um tamanho de



aproximadamente 150 a 200nm, são envelopados, possuem fita dupla de 240 kb que codificam 35 proteínas. O envelope viral contém pelo menos oito glicoproteínas, dentre elas a glicoproteína B, considerada um receptor do vírus e um importante indutor de resposta imune (BRITT et al.,1990). O EBV é um vírus menor que o HCMV, possuindo uma fita dupla de 180 kb. Sua infecção pode persistir nos linfócitos do sangue periférico por vários anos após a infecção (PARK, 1990).

De acordo com Cohen & Greenberg (1986), as infecções herpéticas mistas podem regular seletivamente a produção de citocinas, perturbando, assim, a homeostasia do sistema imune.

Os vírus do herpes podem causar doença periodontal como resultado direto de sua infecção e replicação, ou como resultado de reações da defesa do hospedeiro. Uma infecção viral pode desencadear reações imunes e/ou alterar as respostas de defesa do hospedeiro (CONTRERAS & SLOTS, 2000).

Foi observado que o HCMV infecta principalmente os monócitos e macrófagos periodontais e menos frequentemente os linfócitos T; enquanto que o EBV-1 infecta os linfócitos B (CONTRERAS et al., 1999). Contreras et al. (1999b) detectaram o HSV em linfócitos T e em monócitos/ macrófagos nos tecidos de lesões periodontais de adultos. Mesmo que não tenha sido encontrado DNA do herpes vírus em neutrófilos, segundo Abramson & Wheeler (1994), a infecção por HSV ou HCMV em outras células *in vitro* diminui a fagocitose dos neutrófilos, a resposta oxidativa e a morte intracelular.

Alguns autores relataram que o Linfócito T exerce um papel protetor imprescindível diante de uma infecção por HCMV (BENEDICT et al., 2001). Foi observado que o HSV ao infectar os linfócitos, diminui consideravelmente a atividade destas células (ROUSE et al., 1986), aumentando o risco para infecções periodontais destrutivas.

O HCMV e o HSV parecem ser os responsáveis pelas lesões ulcerativas orais, especialmente em pacientes imunocomprometidos (SCULLY et al., 1991). Quando linfócitos e monócitos são infectados pelo HCMV, a produção de interleucinas e a capacidade de proliferação são reduzidas significativamente. Além disto, a infecção por herpes altera o sistema imune diminuindo ou aumentando a expressão de algumas estruturas (moléculas de histocompatibilidade Classe I e adesão de moléculas) (ITO et al., 1995). Portanto, o rápido colapso periodontal visto em pacientes que apresentam alterações da resposta imune mediada pela diminuição do número de linfócitos T, sugere uma função protetora por parte destas células na doença periodontal (ROSENSTEIN et al., 1989).

Como sugerido por Contreras et al. (2001), as infecções por herpes na periodontite associada ao HIV podem acentuar a imunossupressão local, perturbar a imunidade protetora do periodonto, induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, alterar a integridade estrutural do periodonto e levar ao crescimento de bactérias periodontopatógenas.

Parece que a ativação imune desencadeada pelo herpes ocorre em conjunto com os fatores de virulência bacterianos, enfraquecendo os mecanismos de defesa do periodonto (SLOTS & GENCO, 1984). Se fizermos uma associação relativa à causa entre as infecções herpéticas e

as bacterianas, semelhante às reportadas nas infecções médicas, é mais provável que as infecções virais promovam as infecções bacterianas subgingivais e não o contrário. Segundo Mackowiack et al. (1984), indivíduos que passam por infecção primária ou reativação herpética geralmente demonstram uma propensão aumentada à superinfecções, sejam elas bacterianas ou fúngicas. Além disto, já foi relatado que o HCMV predispõe indivíduos a infecções bacterianas. Ratos colonizados por *Pseudomonas aeruginosa* ou *S. aureus*, apresentam maior taxa de mortalidade quando infectados por doses subletais do vírus HCMV. Os autores concluíram que os ratos infectados pelo vírus apresentam suscetibilidade aumentada a infecções bacteriana e fúngica. Sugeriram que tal fato seja decorrente das várias alterações causadas pela infecção viral no sistema imune do hospedeiro (REDPATH et al., 1999).

Conforme os achados de Mackowiack et al. (1984), células eucariotas infectadas por vírus expressam proteínas virais em sua superfície que agem como receptores, ocasionando novos sítios de ligação bacteriana. Além disso, de acordo com Heurlin et al. (1991), células epiteliais mortas pelo vírus também expõem sítios de ligação para as bactérias através de constituintes de sua membrana basal.

O HCMV e o HSV são capazes de destruir fibroblastos *in vitro* (RONES et al., 1982). Foi proposto por Ito et al. (1995) que a infecção por HCMV altera a expressão de moléculas adesão nos fibroblastos infectados, fato que contribui para o estabelecimento de uma inflamação periodontal.

Na regeneração tecidual guiada, Mc Donald et al. (1998) concluíram que os herpes vírus alteram a função dos fibroblastos, diminuindo o potencial regenerativo do ligamento periodontal.

Os herpes vírus periodontais podem induzir alterações metabólicas e suprimir as atividades dos linfócitos e macrófagos, causando uma debilidade no sistema imune diante de outras infecções, como as bacterianas (CONTRERAS et al., 1999). De fato, 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. Seymour (1987) relatou que a ativação, proliferação e diferenciação de linfócitos B estão associadas à progressão da doença periodontal. O EBV -1 codifica uma proteína, a BCFR1, que se assemelha estruturalmente e funcionalmente à interleucina 10 (TAGA et al., 1995). Sabe-se que a IL-10 suprime a produção de IL-2, IFN- $\gamma$  e linfotóxina, polarizando o sistema à uma resposta tipo Th2 (ROSEN et al., 1977). De acordo com Seymour (1987), uma resposta tipo Th1 está associada à proteção contra a doença periodontal; enquanto que a resposta tipo Th2, à progressão da doença (GEMMELL & SEYMOUR, 1994). Além disto, a infecção por EBV pode induzir uma mudança nas sub-populações de linfócitos B, aumentando a relação de Linfócitos B e plasmócitos/monócitos (CELENLIGIL & EBERSOLE, 1997). Este tipo de herpes também altera o número de linfócitos T. Conforme os achados de Rickinson & Kieff (1996) e Stashenko et al. (1987), o EBV induz a uma proliferação exacerbada de linfócitos T, cuja atividade está relacionada ao reconhecimento e destruição de células infectadas pelo vírus. Na doença periodontal uma disfunção imune mediada pela infecção por EBV favorece a proliferação subgengival de bactérias periodontopáticas (CONTRERAS et al., 1999).

A infecção por HCMV aumenta a produção de interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) de monócitos e macrófagos (MACKOWIACK et al., 1984; IWAMOTO et al., 1990). A produção aumentada destas citocinas pró-inflamatórias está associada à maior suscetibilidade à doença periodontal destrutiva. Interleucina 1 beta e fator de necrose tumoral alfa podem aumentar a produção de metaloproteinases e mediar a destruição óssea periodontal (STASHENKO et al., 1991). 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 de células de defesa (HEURLIN et al., 1995). A imunossupressão também ocorre devido ao distúrbio direto das células linfóides, pela diminuição da expressão de microglobulina  $\gamma 2\beta$ , indução de auto-anticorpos e produção de mediadores inflamatórios solúveis (MEYERS et al., 1986; ARBUSTINI et al., 1992; BEERSMA et al., 1993).

O modo pelo qual o periodonto é infectado por HCMV, proposto por Contreras et al. (1999), considera que na doença periodontal, as células inflamatórias infectadas por herpes poderiam ser a fonte de partículas virais infectantes. Segundo Kapasi & Rice (1988), o HCMV pode infectar os monócitos do sangue periférico ou suas células progenitoras na medula óssea. Quando estes monócitos são recrutados para os tecidos periodontais a fim de participar da resposta imune contra microorganismos periodontopatogênicos, a diferenciação em macrófagos pode significar sinal verde para o ciclo de replicação do HCMV. Assim, partículas viáveis do vírus podem infectar as células periodontais adjacentes como as epiteliais, endoteliais e fibroblastos. Todo o evento que promova a diapedese das células

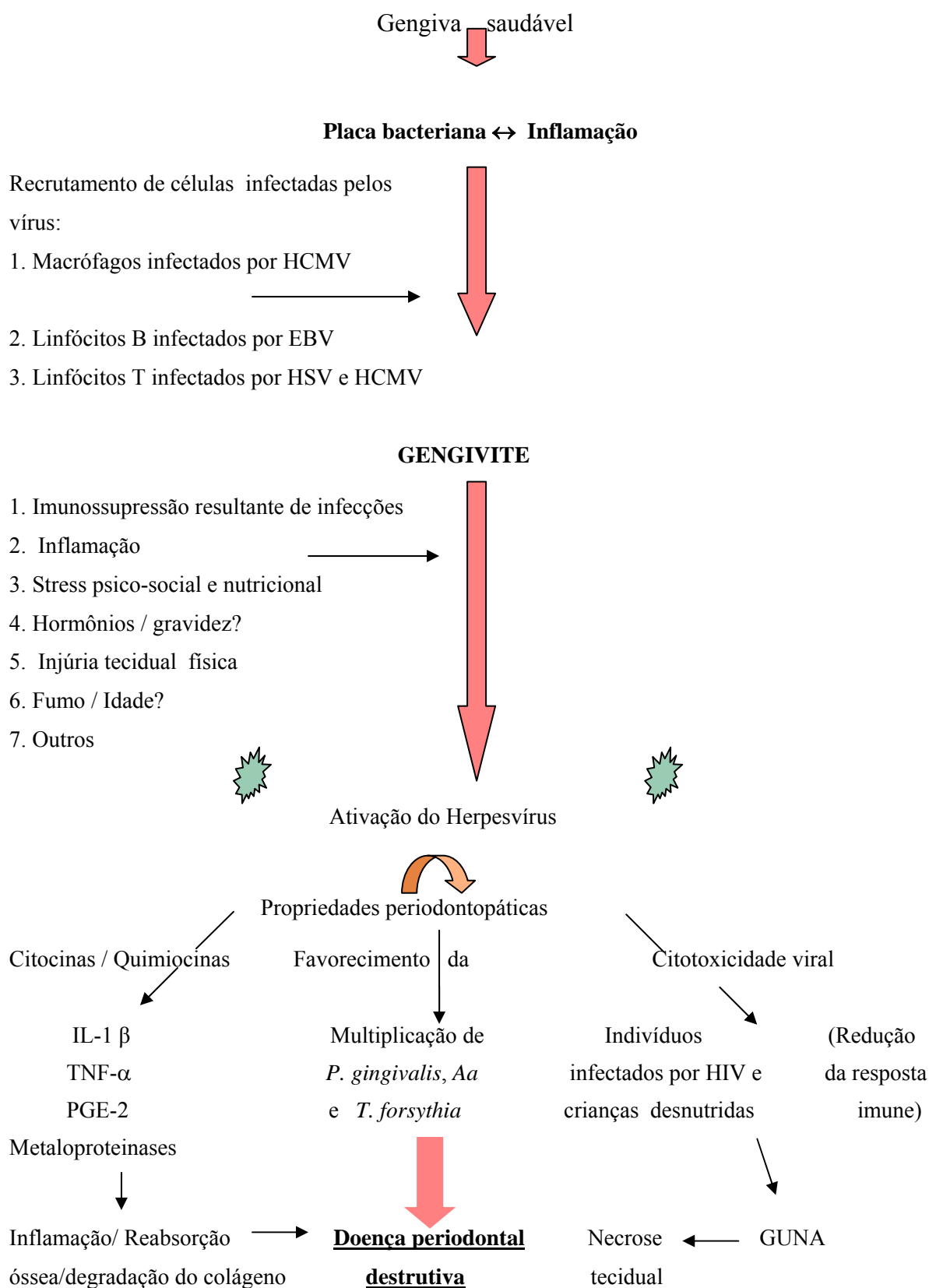
inflamatórias para o tecido, como a infecção bacteriana, aumenta a chance de infecção pelo HCMV naquele tecido. Portanto, a gengivite seria uma situação plausível para o estabelecimento/disseminação de infecção por HCMV no periodonto (CONTRERAS et al., 1999).

Quando as células epiteliais são infectadas pelo HCMV, elas também têm diminuída a sua capacidade protetora, fato que contribui para a melhor aderência de *P. gingivalis* no tecido, resultando na invasão de outras células do hospedeiro (MADIANOS et al., 1997). Por outro lado, os autores afirmaram que ao invadir o epitélio, *P. gingivalis* compromete a resposta imune, porque bloqueia a migração dos leucócitos polimorfonucleares e diminui a produção de IL-8 por estas células.

Segundo Flammand et al. (1993) o HHV-6 infecta mais freqüentemente os linfócitos T e ocasionalmente os linfócitos B. Nas co-infecções de linfócitos, o HHV-6 pode interagir com o EBV e agravar a doença herpética. Então, se o HHV-6 é encontrado em lesões periodontais (PARRA & SLOTS, 1996; CONTRERAS et al., 1997; CONTRERAS et al., 2001) assim como o EBV (PARRA & SLOTS, 1996; CONTRERAS et al., 1999 a e b; CONTRERAS et al., 2000; HANOOKAI et al., 2000; MICHALOWICKZ et al., 2000; TING et al., 2000), esta associação pode representar algo na patogênese da periodontite. A combinação do HSV com outros vírus também pode ser danosa ao periodonto, uma vez que o mesmo possui tropismo para os tecidos periodontais (AMIT et al., 1992; PORTER et al., 1993).

As diferenças quanto à distribuição e à taxa de ativação dos sítios positivos para o herpes podem explicar a natureza sítio-específica da progressão da periodontite (SLOTS & CONTRERAS, 2000). A reativação do herpes ocorre espontaneamente ou como resultados de infecção, febre, drogas, trauma tecidual, stress emocional, exposição à luz ultravioleta e outros fatores que diminuem as atividades do sistema imune (SCULLY, 1996).

Uma revisão sobre o envolvimento do citomegalovírus e do Epstein-Barr-1 nos diversos tipos de doença periodontal foi publicada por Slots & Contreras (2000). Neste trabalho, os autores propuseram um modelo para a periodontite relacionada à infecção por herpes (FIG. 1). A formação da placa bacteriana com a subsequente gengivite constituiria os eventos primários para o desenvolvimento da periodontite. O acúmulo de herpes vírus se daria através do influxo de células para o tecido gengival inflamado como: linfócitos B e T, monócitos e macrófagos. Como já mencionado, uma grande carga de vírus do herpes aumenta o risco para algumas doenças, especialmente em pacientes imunocomprometidos. Segundo Lang et al. (1996), o aumento da inflamação gengival está associado à progressão da periodontite. Se isto é verdade, uma maior concentração de células de defesa carregadas com herpes vírus também desempenharia um papel nesta gengivite (CONTRERAS et al., 1999). Desta forma, o contrário também seria verdadeiro, já que a redução da gengivite parece diminuir o número de herpes no periodonto, como sugerido por Hanookai et al. (2000).



**FIGURA 1 - Modelo para a periodontite relacionada ao herpesvírus.**

**FONTE - Adaptado de SLOTS & CONTRERAS, 2000.**



Muitos indicadores de risco para a doença periodontal, incluindo a infecção por HIV, stress psico-social e físico, gravidez e alterações hormonais (SALVI et al., 1997) também representam um potencial para a reativação do herpes. Em vista disso, Slots & Contreras (2000) sugeriram que se alguns indicadores de risco para a doença periodontal também ativam os herpesvírus, então a terapia da doença deveria ser direcionada ao controle dos herpesvírus assim como aos próprios indicadores de risco.

Já foi relatado que a ativação do herpes ocorre frequentemente na periodontite associada ao HIV (Ting et al., 2000). 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. De acordo com Flammand et al.(1993), o HHV-6 pode reativar EBV. Alguns autores concluíram que as infecções do herpes 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 um superproliferação de bactérias periodontopatógenas. Diante disto, eles propuseram que a ativação do HIV pelo herpesvírus pode ser a causa do rápido colapso periodontal observado na periodontite relacionada ao HIV (CONTRERAS et al., 2001).

A evidência de que o HCMV ativo pode estar associado à atividade da periodontite também foi encontrada no estudo delineado por Wara-Aswapati et al., (2003). Foi descoberto que produtos genéticos liberados durante a ativação daquele vírus transativam a expressão de IL-1 $\beta$  pelas células do hospedeiro.

## 2.2 O papel do herpes vírus na doença periodontal humana

A doença periodontal constitui uma família de doenças relacionadas que se diferem na etiologia, história natural, progressão e resposta à terapia, mas possuem uma cadeia básica de eventos. Estes mecanismos patológicos básicos estão presentes em todas as formas induzidas por placa. Estes eventos são influenciados por modificadores (genéticos, ambientais ou adquiridos) que se diferem de acordo com o estágio e a forma da doença. O quadro clínico observado é resultado de uma complexa interação entre estes eventos modificadores e desafio microbiano (PAGE et al., 1997). No entanto, Saygun et al. (2004), alertam que alguns tipos de periodontite crônica e agressiva não representam doenças distintas mas se encontram num espectro contínuo, cuja expressão clínica depende da presença de agentes infecciosos específicos e da condição imune do hospedeiro. Várias espécies bacterianas têm sido incriminadas na etiopatogênese da doença, mas uma causa bacteriana sozinha parece ser insuficiente para explicar as várias apresentações clínicas da doença. Estudos recentes sugerem que herpes-vírus periodontais constituem uma importante fonte para a causa da destruição dos tecidos periodontais (SLOTS, 2002; YAPAR et al., 2003).

Baseando na literatura existente, Ogawa et al. (1982) foram os primeiros pesquisadores a isolarem o vírus do herpes em pacientes com doença periodontal. Logo após, Ehrlich et al. (1983) citaram a presença de antígenos específicos do herpes no tecido gengival. Eles detectaram genoma viral do HSV-1 nas células epiteliais do sulco gengival de pacientes que estavam sob tratamento.

Em 1989, Sjodin et al. associaram a infecção pelo HCMV na primeira infância à ocorrência de lesões semelhantes às da periodontite juvenil localizada na dentição primária.

Na década de 90, uma nova linha de pesquisas retomou o possível papel do vírus na etiopatogênese da doença periodontal. Langford et al. (1990) associaram a presença de HCMV a lesões ulcerativas orais em pacientes infectados pelo HIV. Em outro estudo, o HCMV e HSV foram associados a lesões ulcerativas orais principalmente em pacientes imunocomprometidos (SCULLY et al., 1991). Outros autores também confirmaram a presença de infecção pelo HCMV nas lesões periodontais agudas num paciente HIV positivo. Na verdade, eles relataram um caso clínico de infecção oral por HCMV que, a princípio, exibia características muito semelhantes às da periodontite associada ao HIV (DODD et al., 1993).

Os achados de Abramson & Wheeler (1994) confirmaram que pacientes com infecções agudas virais apresentam risco maior para certas infecções bacterianas. Contreras & Slots (1996) determinaram a frequência de certos tipos de vírus em 27 portadores de periodontite e concluíram que 89% dos pacientes abrigavam pelo menos um tipo de vírus em suas bolsas. As infecções mistas foram encontradas com maior frequência nas bolsas periodontais profundas ( $p=0,015$ ); assim como o HCMV ( $p=0,023$ ).

Parra & Slots (1996) investigaram presença de herpes simples (HSV-2), Epstein-Barr vírus (EBV), Citomegalovírus (HCMV), Papiloma vírus humano (HPV) e Vírus da imunodeficiência humana (HIV) no fluido crevicular de 30 pacientes com periodontite avançada e 26 pacientes com gengivite. Através da técnica do PCR, eles verificaram que 78%

dos pacientes com periodontite avançada abrigavam pelo menos 1 tipo de vírus mencionado anteriormente. Em 60% deles havia o HCMV, EBV em 30%, HSV 20% e HPV 17% destes pacientes. Nos pacientes com gengivite, somente foi encontrado o HCMV em 8 pacientes (31%) dos 26 estudados. Houve diferença estatística de indivíduos infectados por vírus no grupo da periodontite e no grupo da gengivite ( $p=0.001$ ; qui-quadrado). Quarenta por cento dos pacientes com periodontite abrigavam mais de um tipo de vírus representando uma co-infecção viral.

De acordo com Contreras et al. (1997), a presença do HCMV e outros tipos de vírus pode contribuir para o estabelecimento e/ou progressão da gengivite ulcerativa necrosante aguda em crianças nigerianas desnutridas.

O vírus do herpes também interfere na cicatrização. Foi observado que quando a bolsa periodontal continha HCMV ou EBV-1, a média de ganho de inserção pós-tratamento era de 2.3 mm, sendo que em sítios não infectados pelos vírus esta média aumentava para 5.0 mm ( $p=0.04$ ) (MC DONALD et al., 1998).

O primeiro estudo que associou replicação viral com atividade da doença periodontal foi o de Contreras & Slots (1998). Eles detectaram RNAm da principal proteína do capsídeo do HCMV somente nas bolsas periodontais profundas, indicando a replicação do vírus. Segundo Gozlan et al.(1993), a transcrição de RNAm tardio só acontece no ciclo lítico completo, indicando, assim, a ativação viral.

Um estudo conduzido por Contreras et al. (1999a) avaliou a relação entre a infecção por vírus do herpes, a doença periodontal e o potencial patogênico das bactérias em 99 pacientes portadores de periodontite e 41 portadores de gengivite. Eles encontraram pelo menos um tipo de vírus (EBV, HSV ou HCMV) em 53% dos pacientes com periodontite avançada, sendo que 23% deles mostravam co-infecção. Relataram que EBV-1, HCMV e pacientes com infecção mista (os dois tipos de vírus) exibiam altas taxas de co-infecção por *P. gingivalis* X *P. nigrescens*, *P. gingivalis* X *B. forsythus*, *P. intermedia* X *P. gingivalis* e *P. gingivalis* X *T. denticola*. O estudo demonstrou uma associação positiva entre EBV-1 e HSV subgingivais e gravidade clínica da doença periodontal, com a presença de importantes bactérias periodontopáticas. Nenhuma associação foi encontrada entre os vírus e *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Tal fato é devido à amostra da pesquisa, que era composta por outras formas de periodontite, não tendo participação de periodontites de início precoce, onde Aa tem o seu papel mais importante. Sugeriu-se que herpes vírus no periodonto possam alterar a defesa local facilitando a colonização inicial e o subsequente crescimento de bactérias periodontopatógenas.

A inédita associação herpes vírus e doença periodontal decorrente da Síndrome de Papillon Le-Frève foi observada por Velazco et al. (1999). Também foram detectados o HCMV e o EBV-1 nas lesões de uma paciente portadora da síndrome.

A relação entre o Aa e os herpesvírus foi estudada por Ting et al.(2000). Eles avaliaram 11 pacientes portadores de periodontite juvenil localizada (PJL). Oito pacientes abrigavam o HCMV, sete o EBV-1, um o EBV-2, seis o HSV e oito abrigavam dois ou mais tipos do vírus. Em comparação com sítios saudáveis dos mesmos pacientes foi encontrado HCMV

em dois pacientes, assim como o EBV-1; um sítio infectado pelo HSV e apenas dois sítios apresentaram co-infecção. O HCMV e co-infecção viral (onde há dois tipos do vírus) foram mais freqüentemente encontrados em lesões periodontais do que em sítios não doentes ( $p=0.031$ ). Nos indivíduos positivos para o HCMV, a ativação do vírus ocorreu mais freqüentemente nas lesões periodontais do que nos sítios saudáveis. *Aa* foi observado mais freqüentemente nos pacientes HCMV positivos que mostravam ativação do vírus do que aqueles que o abrigavam no seu período de latência. O HCMV ativo também foi associado à ausência da lâmina dura da crista alveolar. A infecção latente do HCMV foi detectada em dois dos três pacientes mais velhos que exibiam a doença em caráter menos agressivo. As lesões que não exibiam o HCMV também não abrigavam o *Aa*. Os vírus HCMV, EBV-1 e HSV foram encontrados mais freqüentemente em bolsas periodontais profundas. Endossando os achados de Contreras et al. (1999), este estudo sugere que as alterações desencadeadas pela infecção viral aumentam o potencial de multiplicação dos patógenos periodontais com subsequente perda de inserção. A alta freqüência de infecção ativa do HCMV na PJL pode ter muitas causas. A puberdade é um importante período de infecção primária ou re-infecção por HCMV e EBV. As alterações do sistema imune relacionadas com a puberdade podem contribuir para ativação do HCMV (KELLEY, 1989). A atividade sexual, assim como o beijo, facilita a transmissão destes vírus (SOHN et al., 1991).

A associação entre periodontite juvenil e *P. gingivalis*, *A.actinomycetemcomitans*, o citomegalovírus (HCMV) e o Epstein-Barr tipo 1 (EBV-1) foi tema de estudo para Michalowickz et al. (2000). Avaliando 100 adolescentes jamaicanos, eles encontraram forte associação entre as bactérias testadas e os vírus, indicando que as espécies raramente foram encontradas sozinhas. Na análise bivariável, o HCMV e *Aa* foram fortemente associados à

periodontite juvenil ( $p < 0.001$ ). Ao contrário, o EBV-1, e não o HCMV, foi associado com periodontite inicial. Se periodontite inicial e periodontite juvenil são formas distintas da doença, então seria esperado que diferentes tipos de vírus estivessem envolvidos na etiologia destas condições. Eles também relataram que a associação com a periodontite juvenil era mais forte quando os dois, *P. gingivalis* e HCMV estavam presentes. Além disso, pacientes que se mostraram positivos para ambos microrganismos exibiram maior perda óssea do que aqueles que abrigavam somente uma das espécies ou nenhuma delas. Nenhuma evidência foi encontrada a respeito do poder deletério da associação do HCMV e EBV-1 para os tecidos periodontais.

Intitulado como “Herpes vírus na doença periodontal humana”, Contreras & Slots (2000) realizaram uma extensa revisão sobre o assunto. E postularam:

Se alguns tipos de doença periodontal destrutiva são realmente o resultado de infecção oportunista bacteriana mediada pelo herpes, então uma nova abordagem quanto à prevenção e tratamento da periodontite poderia estar centralizada no controle deste vírus - que possibilita a superinfecção das bactérias periodontopatógenas. Vacinação contra herpes se constituiria então numa boa medida para a profilaxia e tratamento da doença.

Apesar da família do herpes, especialmente o HCMV e EBV-1, ser detectada com grande frequência nas lesões periodontais, há pouca informação a respeito da relação entre herpes tipo 6 (HHV-6), herpes tipo 7 (HHV-7) e herpes tipo 8 (HHV-8) e a doença periodontal. Uma pesquisa de Mardirossian et al. (2000) determinou a ocorrência destes herpes vírus em 21 soropositivos e 14 soronegativos para HIV, todos portadores de periodontite. Herpes tipo 6 e herpes tipo 7 foram constatados com frequência similar tanto nos indivíduos HIV negativos como nos HIV positivos. Mas o herpes tipo 8 só foi detectado nos indivíduos soropositivos.

Dupla ou tripla infecção herpética no periodonto ocorreu em 67% dos pacientes soropositivos. Como não se fez distinção entre o vírus ativo ou latente, não se sabe se a terapia anti-HIV administrada afetou a condição destes vírus no periodonto. Os autores concluíram que o periodonto constitui um sítio de infecção ou de reserva para os três vírus. Além disso, os herpes vírus gengivais do paciente soropositivo podem sofrer reativação e portanto contribuir para a patologia periodontal. Eles alertaram para o fato de haver a possibilidade da contaminação através da saliva, que abriga vírus ativos, a outros indivíduos. Portanto, sugeriram que a redução do risco de transmissão do vírus do herpes pode ser realizada através de uma terapia periodontal profissional e medidas de higiene oral.

Ainda nesta linha de pesquisa, Hanookai et al. (2000) averiguaram a participação do herpes vírus na patogênese da periodontite nos portadores da Síndrome de Down. Oitenta e quatro por cento dos pacientes apresentavam periodontite grave ou moderada. EBV-1 e HCMV foram encontrados em alta frequência nas bolsas mais profundas – 5 a 8mm. As bactérias que mais freqüentemente foram detectadas foram *P. intermedia* (74%), espécies de *Fusobacterium* (63%), *B. forsythus* (42%), *P. gingivalis* (32%) e *A.actinomycescomitans* (26%). Numa segunda avaliação, realizada uma semana após a raspagem e alisamento radiculares, o HCMV não foi detectado em nenhum sítio, e o EBV-1 em 5%. Porém, um mês após a raspagem subgengival, EBV-1 reapareceu em 21% e HCMV em 32% das bolsas profundas estudadas. A recorrência dos vírus após trinta dias da terapia foi causada pelo aumento do influxo de células inflamatórias infectadas pelo herpes, já que a raspagem diminui o número destas células. Pelo fato do herpes reduzir a defesa periodontal contra a colonização e a subsequente proliferação de bactérias periodontopatógenas, foi sugerido que a combinação herpes vírus – bactéria desempenhe um importante papel na etiopatogênese da doença periodontal nos



indivíduos trissômicos. Em outro estudo, Contreras et al. (2000), confirmaram a presença freqüente do HCMV e do EBV-1 em lesões periodontais. Sugeriram também a possibilidade de utilizar tecido gengival para pesquisar a freqüência dos herpes tipos: HHV-6, HHV-7 e HHV-8.

Apesar da extensiva investigação dos herpes vírus na periodontite, o mais prevalente deles, o HSV, ainda não tinha sido o principal alvo de pesquisas. Contreras & Slots (2001) verificaram a ocorrência do herpes simples tipos 1 e 2 (HSV-1, HSV-2) nas lesões periodontais. Os participantes da amostra foram 17 adultos portadores de doença periodontal, três portadores de periodontite associada ao HIV e três portadores de periodontite juvenil localizada (PJI). Cada paciente foi submetido a uma coleta de três sítios, sendo que os portadores de periodontite crônica do adulto também foram submetidos a coleta de sítios saudáveis. O HSV-1 foi observado em todas as 26 amostras. O HSV-2 não foi detectado em nenhuma amostra, sendo portanto, um microorganismo raro nos sítios periodontais. Segundo Allen & Hitchcock (1991) uma vez adquirido o HSV-1 na primeira infância, há o estabelecimento de imunidade contra uma posterior infecção pelo HSV-2, devido ao efeito protetor dos anticorpos de reação cruzada entre os dois tipos do vírus.

Como concluído por Contreras et al. (2001), as infecções por herpes na periodontite associada ao HIV podem acentuar a imunossupressão local, perturbar a imunidade protetora do periodonto, induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, alterar a integridade estrutural do periodonto e levar ao crescimento de bactérias periodontopatógenas. Os autores sugerem ainda que a periodontite associada ao HIV é resultante de uma infecção mista, onde interagem o HIV, herpesvírus e as bactérias periodontopatogênicas. Com intuito de determinar o possível papel do herpes na doença periodontal associada ao HIV, estes autores determinaram

a frequência dos sete tipos de herpes em biópsias de lesões periodontais em 21 pacientes HIV positivos. Para o grupo controle, havia 14 pacientes HIV negativos com periodontite. Na periodontite associada ao HIV, o vírus mais prevalente foi o HCMV, detectado em 81% das amostras, seguido do HHV-6 detectado em 71%, e HHV-7 em 67% das biópsias. Na periodontite não associada ao HIV, o HCMV foi identificado em 50% das amostras, assim como o EBV-1 e o HSV, foram identificados em 43% delas. Diferentemente de Contreras et al. (1999), foi detectado EBV-2 nas lesões periodontais associadas ao HIV. Foi observada também uma frequência maior do HHV-6 nas lesões periodontais nos pacientes HIV positivos. Assim como nos estudos anteriores (MARDIROSSIAN et al., 2000; CONTRERAS et al., 2000), o HHV-8 foi detectado exclusivamente nas biópsias gengivais de pacientes soropositivos.

Segundo Kamma et al. (2001) o HCMV, EBV-1, HSV e infecções herpéticas mistas, assim como *P. gingivalis*, *D. pneumosintes* e co-infecção por ambos, foram estatisticamente associados à doença periodontal ativa. Eles entenderam que a infecção por herpes seja imunossupressora e que talvez facilite o crescimento destas bactérias.

No entanto, um estudo conduzido na Itália não sugere associação entre as espécies de herpes-vírus e a doença periodontal. Cassai et al., (2003) avaliaram a frequência de seqüências de DNA do HHV-6, 7 e 8 em 13 pacientes portadores de periodontite crônica e 10 pacientes periodontalmente saudáveis. O HHV-7 foi o mais prevalente dentre os tipos examinados, tanto em pacientes comprometidos pela doença quanto em pacientes saudáveis. A prevalência do HHV-6 e HHV-8 foi similarmente baixa nos dois grupos de pacientes. De acordo com os

resultados obtidos, este estudo não endossa a associação entre estes tipos de vírus e a doença periodontal destrutiva.

Novas evidências sobre a participação do HCMV são adicionadas com o estudo de Kubar et al., (2004) que, analisando o material coletado de bolsas periodontais de 16 pacientes com periodontite agressiva, encontrou em 68,8% das amostras, a presença do citomegalovírus. Em contrapartida, nenhum vírus foi encontrado nos sítios saudáveis.

Corroborando com os achados que revelam uma ligação entre herpesvírus e a periodontite agressiva, Saygun et al., (2004a) compararam pacientes com periodontite avançada e pacientes que não exibiam a doença. Nesse estudo, HCMV, EBV-1 e HSV-1 foram associados com *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* e *C. rectus*.

Pesquisadores japoneses (IDESAWA et al., 2004) também detectaram o vírus EBV-1 em 48% dos seus pacientes com periodontite. O percentual caiu para 15% quando foram analisados os controles. O diferencial deste trabalho foi o reservatório: os vírus foram quantificados através das amostras da saliva desses pacientes. Neste estudo, o EBV-1 foi associado ao sangramento à sondagem ( $p < 0,01$ ). Além disto, foi observado também um decréscimo significativo da quantidade de EBV-1 após o tratamento.

A presença dos vírus também foi relatada em abscessos periodontais. O HCMV foi detectado em 66,7% das amostras e a porcentagem do EBV-1 foi de 72,2%. Houve co-infecção em 55,6% das amostras. Após 4 meses do tratamento cirúrgico e administração de doxiciclina,

nenhum dos vírus citados foram detectados nos sítios anteriormente infectados (SAYGUN et al., 2004b).

A técnica de PCR multiplex foi utilizada para testar a presença dos vírus HCMV e EBV-1 em pacientes italianos (SANTANGELO et al., 2004). Apesar de não terem conseguido demonstrar diferença estatisticamente significativa da frequência desses vírus entre pacientes e controles, foi detectado um excesso de HSV-1 nesses pacientes, confirmando uma provável participação do herpesvírus na doença.

Pesquisadores chineses (LING et al., 2004) publicaram um artigo que associa a presença do vírus à gravidade da periodontite. A frequência do EBV-1 foi significativamente maior nos pacientes que apresentavam maior profundidade de sondagem  $\geq 4\text{mm}$  ( $p < 0,05$ ).

Mais recentemente foi publicado que os sítios periodontais podem constituir uma fonte EBV-1 e HCMV para saliva. Segundo esses autores (SAYGUN et al., 2005), o tratamento periodontal diminui a carga desses vírus na saliva, o que ajuda a diminuir a transmissão entre pessoas, por exemplo, de uma mesma família.

A literatura carecia de um estudo que diferenciasse se os sítios que estão em atividade de doença periodontal correspondem ao maior número de vírus, pois encontrando níveis elevados de herpesvírus nos sítios em atividade comparados com baixos níveis de vírus nos sítios quiescentes enfatizariam o caráter periodontopatogênico desses microrganismos. Finalmente um estudo quantitativo encontrou uma maior contagem de EBV e HCMV nas

bolsas periodontais de lesões de periodontite agressiva comparado às lesões de periodontite crônica. Encontrou também que uma maior quantidade de vírus estava significativamente associada a um aumento da gravidade da doença (KUBAR et al., 2005). Foi demonstrado que o aumento da contagem subgengival de EBV estava associado a bolsas periodontais profundas ( $p = 0,04$ ; correlação de Spearman) ; que 78% dos pacientes com periodontite agressiva revelaram mais que 10.000 cópias subgengivais do vírus enquanto que na crônica somente 28% dos pacientes exibiram esta contagem ( $p= 0,03$  ; Qui- quadrado); e que quatro dos seis pacientes com bolsas maiores de 6 mm e que nenhum dos 14 pacientes com profundidade de sondagem  $\leq 6$ mm exibiram mais de 100.000 cópias de DNA . Essa é a mais forte evidência da participação dos vírus na doença periodontal publicada até hoje.

Analisando a literatura apresentada, verificamos evidências consistentes sobre a associação dos vírus, principalmente, EBV e HCMV na patogênese da doença periodontal. Desta forma, pretendemos investigar a presença desses dois vírus em sítios com periodontite e gengivite de um mesmo paciente. Esperamos com isto contribuir para a consolidação do papel desses agentes patogênicos na periodontite.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 GERAL**

Investigar a presença dos vírus Citomegalovírus (HCMV) e Epstein-Barr vírus (EBV-1) na doença periodontal agressiva.

#### **3.2 ESPECÍFICOS**

3.2.1 Comparar a frequência do vírus EBV-1 em sítios com periodontite e gengivite de indivíduos com periodontite agressiva .

3.2.2 Comparar a frequência do vírus HCMV em sítios com periodontite e gengivite de indivíduos com periodontite agressiva .

#### **4 HIPÓTESES**

Considerando o nosso modelo de associação hipotético de conversão da gengivite para periodontite, existe uma associação entre a presença do vírus e a perda de inserção.

1. A presença do EBV-1 é significativamente maior nos sítios de periodontite do que nos sítios de gengivite na mesma unidade amostral.
2. A presença do HCMV é significativamente maior nos sítios de periodontite do que nos sítios de gengivite na mesma unidade amostral.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 Desenho de estudo

Estudo transversal - de frequência acumulada - para estabelecer a frequência do HCMV e do EBV-1 nas lesões periodontais.

### 5.2 Amostra e unidade amostral

Foram avaliados pacientes portadores de doença periodontal de faixa etária variada, que estavam em tratamento na Clínica de Especialização de Periodontia da Faculdade de Odontologia da UFMG. Foram avaliados indivíduos que apresentaram diagnóstico de periodontite agressiva, segundo parâmetros de diagnóstico do Workshop de Classificação de Doenças Periodontais e condições (1999). Neste estudo, os requisitos para inclusão foram: pacientes sistemicamente saudáveis que apresentaram perda de inserção não correspondente à idade e que tivesse pelo menos um outro parente que também apresentasse a mesma condição periodontal. Como critérios de exclusão foram considerado : indivíduos portadores de alguma doença sistêmica, indivíduos que tivessem se submetido a um regime antibiótico num período menor que 6 meses antes da data do estudo. Foram estudados 30 sujeitos da pesquisa, sendo que cada um foi submetido a uma coleta de 4 amostras. A seguir, um fluxograma de todas as etapas da metodologia executada (FIG. 2).



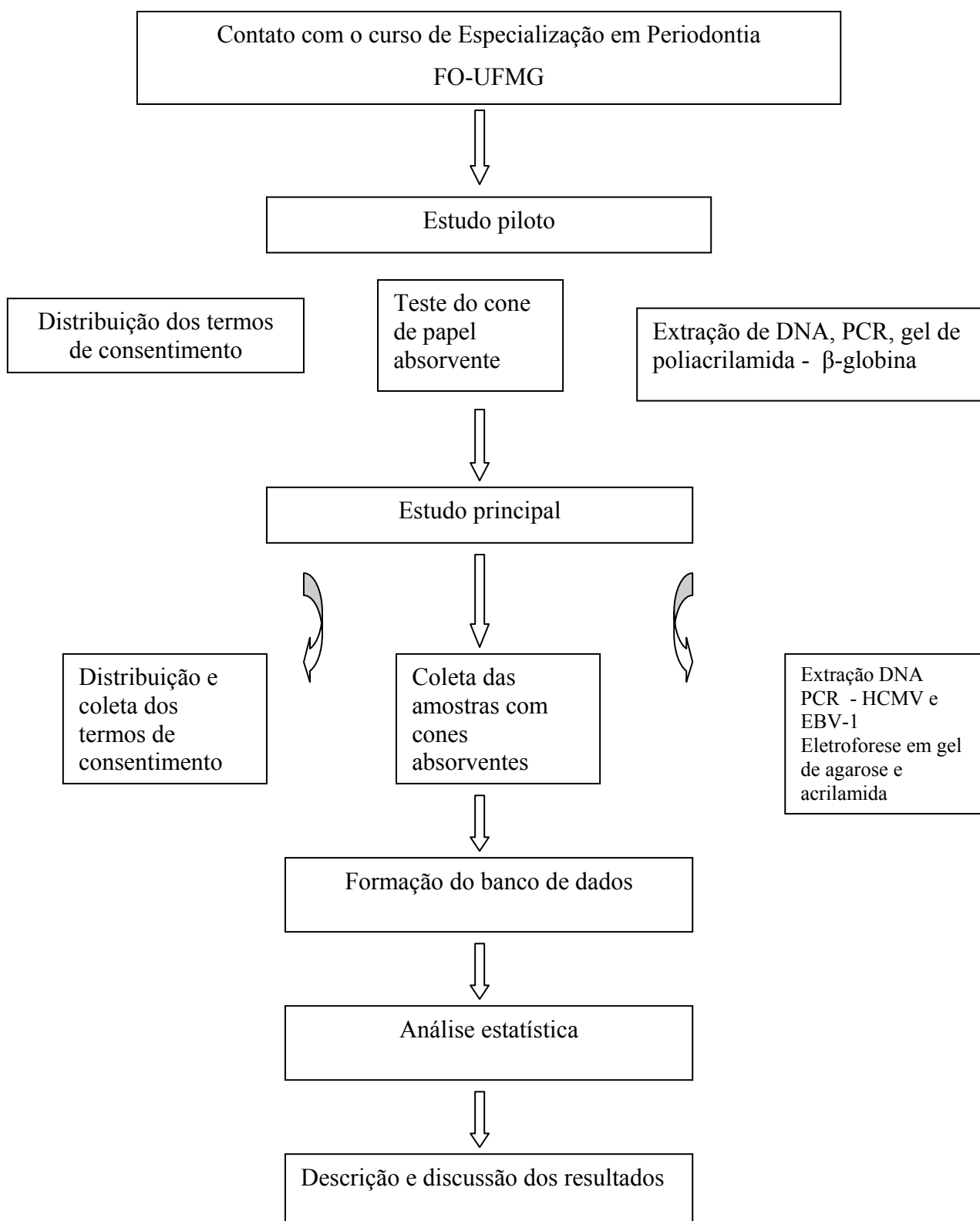
**APROVAÇÃO DO COEP**

FIGURA 2 - Fluxograma explicativo da metodologia empregada.

### 5.3 Considerações éticas

Este estudo foi submetido à avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais e aprovado sob o número de Protocolo 468/2004.

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 (APÊNDICE 1).

Os indivíduos foram orientados em relação a sua condição periodontal, esclarecidos sobre a importância do tratamento, alertados sobre a gravidade e conseqüências da doença periodontal e do risco de perda dental associada.

Todas as informações colhidas terão finalidade exclusivamente científica e a não identificação do paciente na pesquisa será preservada. A participação no estudo pôde ser cancelada e o consentimento retirado pelo paciente a qualquer momento da pesquisa. Foi assegurado o encaminhamento para tratamento mesmo em caso de abandono do trabalho.

### 5.4 Protocolo para a obtenção dos dados

#### 5.4.1 Diagnóstico periodontal e coleta do material para análise

A metodologia adotada partiu da avaliação diagnóstica da condição periodontal da ficha do paciente em questão. A coleta foi realizada sob condições de iluminação e assepsia adequadas, segundo normas de biossegurança. Foram utilizados para a coleta parâmetros

adequada (avental, gorro, óculos, máscaras e luvas), uma fonte de luz artificial, pinça clínica devidamente esterilizada, cones endodônticos de papel absorvente (nº 30 – Tanary) e gaze. Os cones foram devidamente esterilizados.

Trabalhamos com 4 amostras de cada indivíduo. As duas primeiras foram coletadas de sítios que apresentaram a maior profundidade de sondagem –no mínimo 5mm- exibindo concomitantemente sangramento. Houve inserção do cone ao longo da parede da bolsa, procurando atingir a sua porção mais apical. Esclarecemos que neste estudo, o próprio paciente foi o seu controle. Assim, as outras duas amostras foram provenientes de dois sítios com gengivite, do mesmo paciente, mas sem perda de inserção. Os dentes foram previamente limpos com uma gaze antes da coleta do material para remoção de excessos de placa dental. O material colhido foi acondicionado em 400 µl de solução de Krebs contido em tubos plásticos (Eppendorf's) estéreis devidamente identificadas.

#### 5.4.2 Teste piloto

Foi necessária a realização de um teste piloto para detectar a eficácia do cone endodôntico de papel absorvente em obter seqüências de DNA. Cinco pacientes portadores de periodontite participaram do teste com duas amostras cada. A técnica da PCR para o gene  $\beta$ -globina foi usada para comprovar sucesso da coleta e extração de DNA.

#### 5.4.3 Preparo do material coletado e extração do DNA

O DNA foi extraído das amostras biológicas dos indivíduos por uma adaptação do método de BOOM et al.(1990). O precipitado foi misturado a 900µl de solução tampão de lise

(GuSCN 6.0M, Tris-HCl 0,1M, EDTA 0.2M, TritonX 100%) e 30 µl de sílica ( SiO<sub>2</sub>, Sigma S6531, lavado com água pH 2.5 calibrada com HCl). O tubo foi levado ao agitador (AP 56-Phoenix) por 10 segundos. A solução foi incubada a 56° durante 10-15 minutos, e posteriormente centrifugada a 179000g, em microcentrífuga (Eppendorf- centrifuge 5415D), por 1 minuto. Após descarte do sobrenadante, a sílica foi lavada duas vezes com 450 µl de tampão de lavagem (Gu SCN 6.0, Tris HCL 0.1 M), sendo que a amostra foi centrifugada entre cada lavagem.

Foram realizadas duas lavagens sucessivas, desta vez com etanol 70%, e por último, uma lavagem com acetona. Após descartar o sobrenadante, a sílica foi seca em banho seco a 56° C, por 10 minutos, e foram adicionados 100µl de tampão TE - Ph 8.0 (Tris Hcl 10 mM Ph8.0, EDTA 1.0mM). A solução foi em seguida incubada a 56° C por um período de 24 horas. A solução contendo a sílica e o DNA foi agitada por 5 segundos, centrifugada por 2 minutos e o sobrenadante transferido para outro tubo.

#### 5.4.4 Examinador

Todas as etapas da pesquisa foram realizadas pelo próprio pesquisador, tais como coleta, extração do DNA , PCR e eletroforese em gel .

#### 5.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (Polymerase chain reaction) imita o processo natural de duplicação do DNA com a diferença que é realizada em um tubo de ensaio. Esta técnica apresenta um modo de sintetizar milhões de cópias de uma única seqüência de DNA em poucas horas.

A técnica foi descrita por Saiki et al., (1985) e aprimorada pelo mesmo autor em 1988, utilizando a enzima termoestável *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNA polimerase. O protocolo padrão utilizado na maioria das amplificações de uma seqüência de DNA utiliza pares de oligonucleotídeos denominados primers (iniciadores) que delimitam o seguimento de DNA a ser amplificado e funcionam como iniciadores da reação. Além disto, adiciona-se solução de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs), a enzima *Taq* DNA polimerase, aproximadamente 20 ng da amostra de DNA a ser amplificado e tampão de incubação específico (SAIKI et al., 1988). Seguem as condições da PCR para HCMV (QUADRO 1), EBV (QUADRO 2) e beta globina (QUADRO 3).

### QUADRO 1

#### Condições da PCR para HCMV

Componentes	Concentração
Iniciadores	20 pmols de cada
Desoxinucleotídeos Trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,2 mM de cada
DNA	3µL
Taq DNA Polimerase	0,25 unidades por reação
Tampão II C	MgCl <sub>2</sub> 2,25 mM, NaCl- 40 mM, Tris-HCl (pH 8,4) 10 mM e Triton X-100 0,1%

Volume total da reação 25 µL.

**QUADRO 2**

Condições da PCR para o EBV-1

Componentes	Concentração
Iniciadores	20 pmols de cada
Desoxinucleotídeos Trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,2 mM de cada
DNA	3µL
Taq DNA Polimerase	0,25 ul por reação
TampãoIID	MgCl <sub>2</sub> 3,0 mM, KCl- 10 mM, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10mM Tris-HCl (pH 8,4) 10 mM ,Triton X-100 0,1%

Volume total da reação 25 µL.

**QUADRO 3**

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	3µL
Taq DNA Polimerase	1 ou 2 unidades por reação
Tampão 1B	MgCl <sub>2</sub> 1,50 mM, KCl 50 mM, Tris-HCl (pH 8,4) 10mM e Triton X-100 0,1%

Volume total da reação 25 µL.

A amplificação pela PCR envolve ciclos repetidos de desnaturação a 95°C do DNA, o anelamento dos iniciadores às suas seqüências complementares e a extensão dos iniciadores anelados pela *Taq* DNA. A cada ciclo sucessivo duplica-se a quantidade de DNA sintetizada no ciclo anterior. Isto resulta no acúmulo exponencial do fragmento específico  $2^n$ , onde n é o

número de ciclos (SAIKI et al., 1988). A utilização da técnica de nested PCR foi aplicada após a amplificação do material com os iniciadores externos. A partir deste produto, foram utilizados os iniciadores internos, ou seja, amplificou-se um segmento dentro da região amplificada anteriormente.

A técnica *de nested* PCR foi utilizada neste estudo para se detectar o HCMV. Esta foi escolhida por apresentar alta sensibilidade e especificidade no diagnóstico desse vírus (COYLE et al., 1988). Apresenta um 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).

O protocolo para realização do nested PCR foi de acordo com Mc Pherson et al. (1995). Três microlitros da solução de DNA foram utilizados na reação de PCR juntamente com iniciadores específicos (internos e externos). Os iniciadores externos foram 5' ACA TGG AAT CCA GGA TCT GGT GCC 3' E 5' CCC TAT GAT ATG CCA CGA AAA CCG 3'. O mix para reação foi composto de tampão, Taq DNA polimerase, iniciadores e DNTP's totalizando 25 uL (QUADRO 1). A reação foi realizada em 30 ciclos a 95°C por 30 s, 58°C por 45s e 72°C por 45 s utilizando o Applied biosystems (Gene Amp. PCR System 2400). Após a primeira etapa da reação do PCR, 1 uL do produto final foi usado para a segunda etapa da reação com os seguintes iniciadores internos 5' CAA CAC GTA ACG TCT GAA GCC 3' E 5' TAG ACC ACC ATG ATG CCC TCA TCC 3' usando o mesmo programa descrito acima - 30 ciclos a 95°C por 30 s, 57°C por 45s e 72°C por 45 s - porém a temperatura de anelamento foi de 57°C (VICTORIA, 2005). Dez microlitros foram utilizados para visualizar o produto específico de 224 pb em 1,5% gel de agarose corado com brometo de etídio. Controles positivos e negativos foram utilizados nas reações de PCR.

Para as reações do EBV-1 foram utilizados os seguintes iniciadores: 5' GTC ATC ATC ATC CGG GTC TC-3' e 5' TTC GGG TTG GAA CCT CCT TG 3' (AMMATUNA et al 1998). A reação será realizada em 40 ciclos a 95° por 3 min, 94° por 1 min, 56° por 50 s, 72° por 1 min; utilizando o Applied Biosystems (Gene Amp. PCR System 2400). Após a amplificação, 5 µL serão utilizados para visualizar o produto específico de 268 pb em 6,5 % gel de poliacrilamida corado com prata.

Ao fazer a PCR para os dois vírus (EBV-1 e HCMV), a pesquisadora não sabia quais sítios representavam gengivite e quais representavam periodontite, visto que as amostras estavam numeradas. Desta maneira, evitou-se a leitura tendenciosa para os sítios positivos para os vírus.

Em cada reação houve um controle positivo (amostra padrão do Banco da Instituição) e um controle negativo para cada vírus.

Esclarecemos que todas as 120 amostras foram submetidas a PCR da  $\beta$ -globina. Tivemos este cuidado para comprovarmos o sucesso da 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 4.

#### QUADRO 4

Iniciadores para o gene da  $\beta$ -globina

Iniciadores senso	Iniciadores anti-senso
M 5' CAA CTT CAT CCA CGT TCA 3'	5' GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC 3'



O número de ciclos de amplificação da  $\beta$ -globina será 35. As temperaturas e os tempos de desnaturação inicial, desnaturação, anelamento e extensão serão respectivamente de 94°C por 3 min, 95°C por 45 s, 56°C por 30s, 72°C por 10 min. O sinal de amplificação apareceu como uma banda bem definida e individualizada de 262 pb, no gel de poliacrilamida a 6,5% corado com prata.

Ao final do experimento, foram realizadas 120 reações para detectar o HCMV, 120 para o EBV e 120 para a  $\beta$ -globina. O QUADRO 5 ilustra o número total de reações realizadas.

#### QUADRO 5

Cronograma da PCR: total de 480 reações feitas nesta investigação

	PCR	Nested PCR
HCMV (HHV-5)	120	120
EBV-1 (HHV-4)	120	
$\beta$ - Globina	120	

#### 5.6 Visualização dos resultados em gel

O resultado da PCR para HCMV foi visualizado em gel de agarose (1,5%) de acordo com o protocolo de Sambrook et al. (1989). A eletroforese ocorreu em tampão de TAE (1x) nestas condições: 170V, e 200 mA por 45 minutos. A fonte utilizada foi a Amersham Pharmacia Biotech EPS 301. A cuba usada foi International Biotechnologies MPA. Os géis foram

corados com brometo de etídio (0,5 ug/ml) durante 30 minutos e visualizados em luz ultravioleta (Vilber Loumart TFP- M / WL).

Para visualizar o resultado da PCR para  $\beta$ -globina e para EBV-1 foram utilizados géis de acrilamida (6,5%). Foram aplicados 5 $\mu$ l de cada produto juntamente com 1 $\mu$ l de gel loading buffer (GLB) no 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 definida (QUADRO 6). Após o processo, os géis foram secos em papel celofane rico em celulose.

QUADRO 6

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

## 5.7 Análise Estatística

É importante esclarecer que a presença do vírus é que norteou a leitura. Isto quer dizer que dentre duas amostras se só uma for positiva para qualquer vírus, este paciente então será

classificado como positivo, quer para gengivite quer para periodontite. Por exemplo: paciente 10 – das duas amostras de gengivite só uma foi positiva para o EBV-1, o paciente é lido como positivo. O mesmo ocorrendo para as amostras de periodontite, no qual só uma é que foi positiva para o mesmo vírus.

Será considerado estatisticamente significativo qualquer resultado onde for encontrado  $p < 0,05$ .

### 5.7.1 Testes estatísticos

Para testar a presença do EBV-1 nos sítios com gengivite x EBV-1 nos sítios com periodontite do mesmo sujeito da pesquisa, utilizamos o Teste de McNemar, pois a variável é categórica e as amostras são pareadas. Entretanto, o teste de McNemar apresenta maior validade quando o  $n$  dos discordantes (+ - e - +) é  $> 20$ . Na amostra o  $n$  dos discordantes foi apenas 12 (2 + - e 10 - +). Portanto, apesar de  $p < 0,05$ , não pudemos confiar apenas neste resultado. Sendo assim, utilizamos outro teste, o dos Sinais para confirmação dos resultados do Teste de McNemar. O programa utilizado foi BIOESTAT 3.0.

O teste Qui-Quadrado foi utilizado para comparar a frequência do vírus nos sítios separadamente: em sítios de gengivite e em sítios de periodontite. Neste caso, a variável testada é categórica e independente.

Utilizamos o Teste Exato de Fischer para testar: presença dos vírus em relação à idade, ao gênero e à condição de tratamento periodontal. Para essas variáveis categóricas e independentes, não pudemos realizar o Qui-Quadrado porque nas tabelas 2x2 em algumas das caselas houve um número menor que 5. O teste utilizado é a versão exata do Qui-Quadrado.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Caracterização da amostra

Caracterizaremos a amostra quanto ao gênero, idade e condição de tratamento periodontal.

A maioria dos participantes deste estudo era composta por mulheres ( $n = 18$ ) como demonstra o GRÁF. 1.

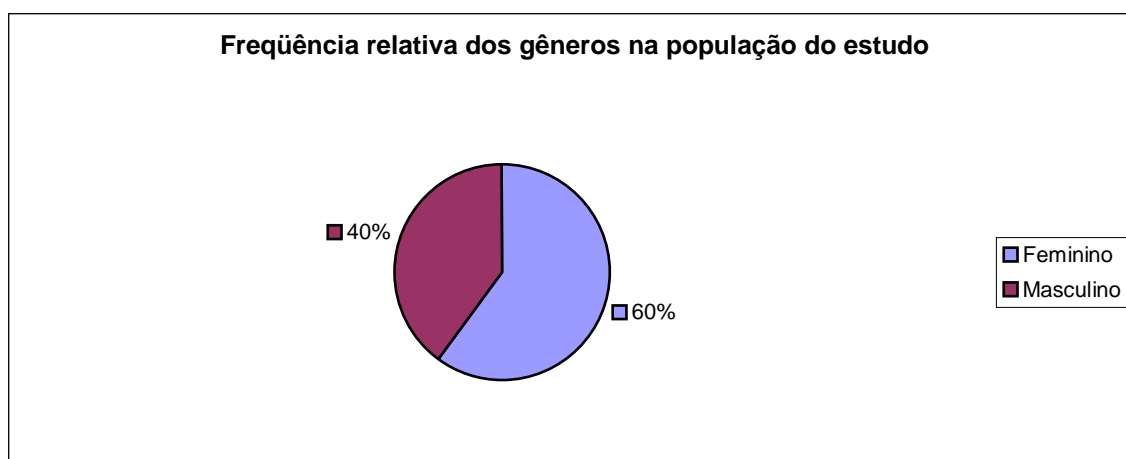


GRÁFICO 1 - Frequência relativa quanto à distribuição dos gêneros na população estudada.

Quanto à distribuição da idade, dividimos a amostra em duas classes: menor que 30 anos e igual ou maior que 30 anos (GRÁF. 2). A idade dos participantes variou entre 18 e 45 anos, apresentando uma média de 32,4 anos.

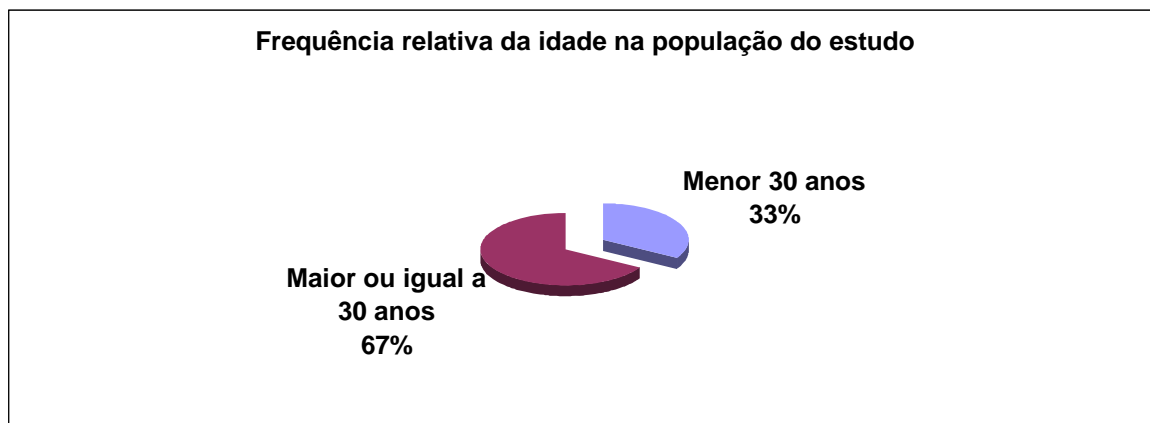


GRÁFICO 2 – Frequência relativa quanto à distribuição da idade da população estudada.

Verificamos que a maioria dos participantes da pesquisa (63%) não fora submetida a qualquer tipo de tratamento periodontal prévio, como consta no GRÁF. 3.

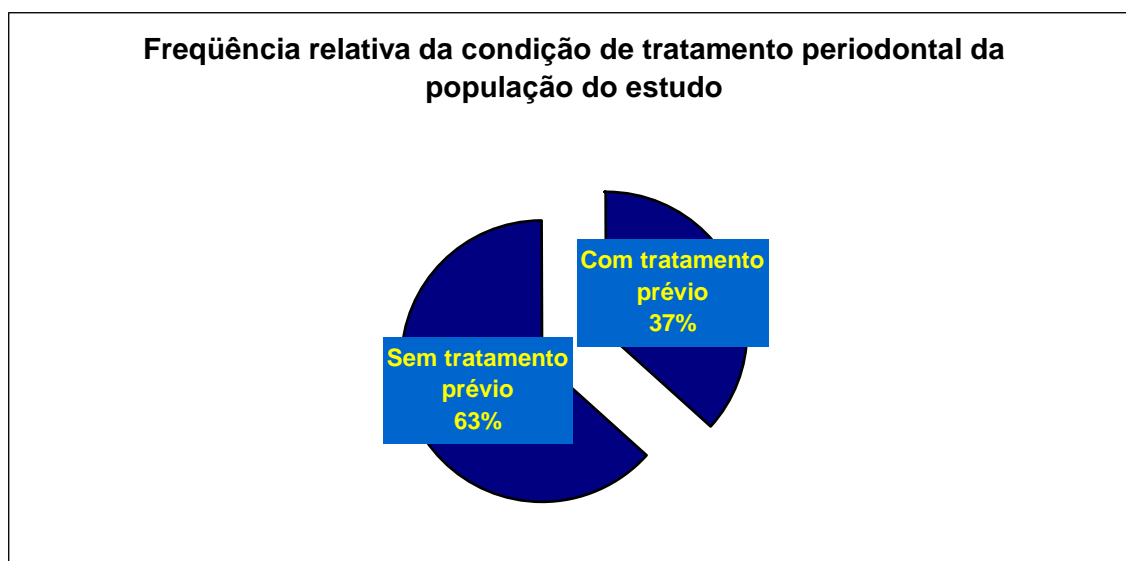


GRÁFICO 3 – Frequência relativa da condição de tratamento periodontal da população do estudo.

## 6.2 Resultados da PCR

O padrão de peso molecular utilizado nos dois tipos de gel foi o 100pb DNA Ladder que apresentava bandas como no Quadro 7.

### QUADRO 7

Bandas fornecidas pelo padrão de peso molecular usado na eletroforese

<b>100bp DNA Ladder</b>
2.027 pb
1500 pb
600 pb
500 pb
400 pb
300 pb
200 pb
100 pb

Os resultados da PCR para o HCMV foram visualizados em gel de agarose. Na FIG.3 podem ser vistas as bandas correspondentes aos produtos específicos do nested PCR (224 pb). A FIG. 4 ilustra o gel de poliacrilamida para a visualização dos resultados da PCR para o EBV-1. A banda correspondente ao produto específico de 268 pb aparece sob variáveis graus de intensidade.

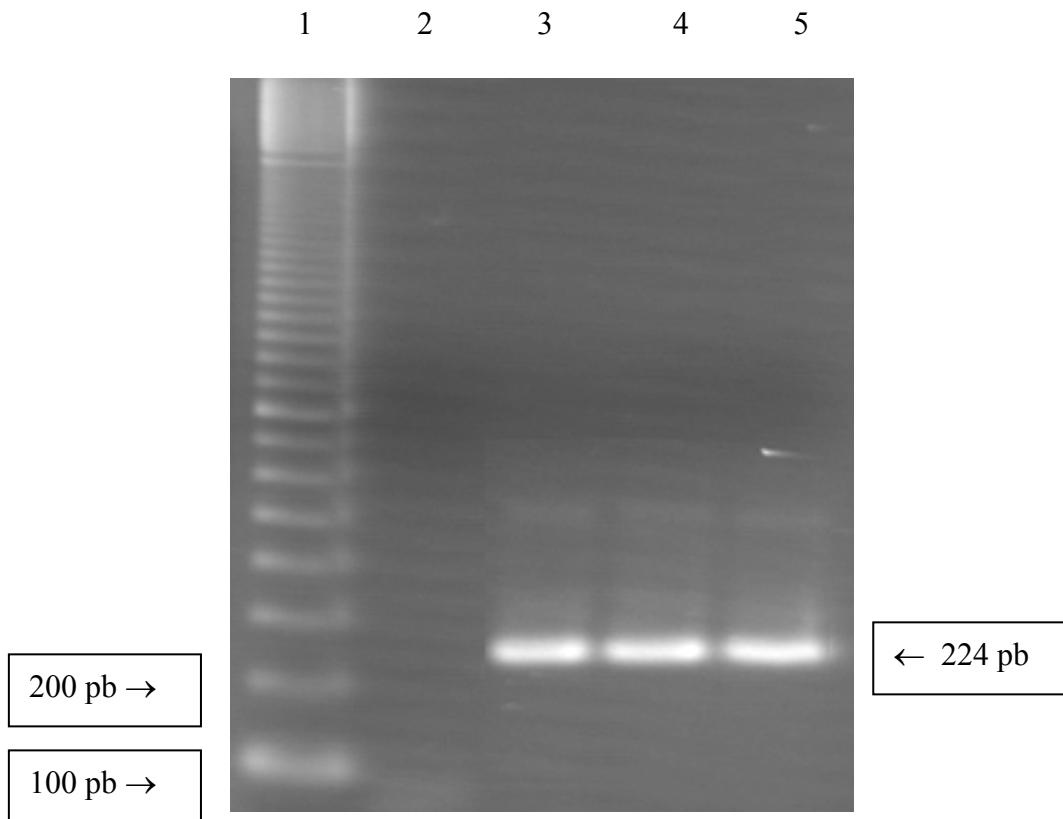


FIGURA 3 - Reação da PCR para detecção do HCMV, visualização dos resultados em gel de agarose. Canaleta 1 padrão 100pb DNA Ladder . Canaleta 2 controle negativo; canaleta 3 : controle positivo; canaletas 4 e 5 : amostras positivas para o vírus.

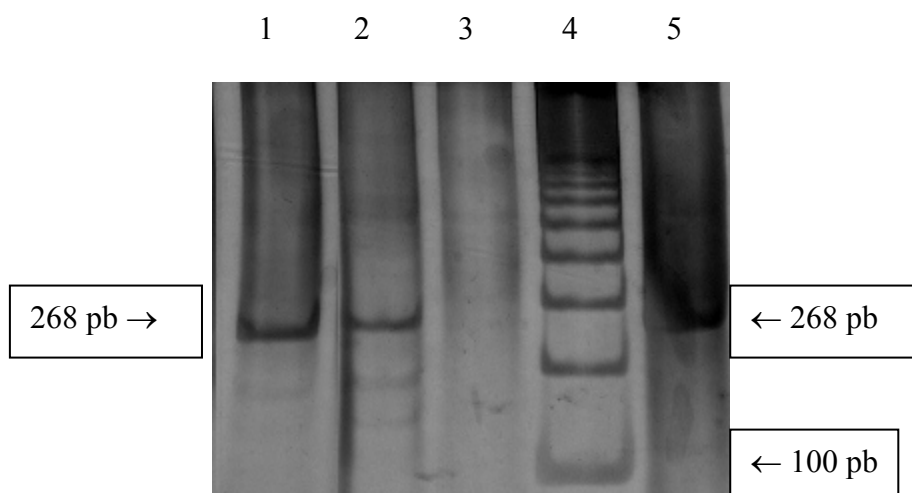


FIGURA 4 - Reação da PCR para detecção do EBV-1. Gel de poliacrilamida mostrando os produtos de PCR (268 pb). Canaletas 1 e 2: amostras positivas para o vírus. Canaleta 3: controle negativo. Canaleta 4: Padrão de peso molecular 100pb DNA Ladder. Canaleta 5: controle positivo.

A relação dos sítios com a respectiva positividade para os vírus EBV-1 e HCMV está na TAB.1. As amostras estão enumeradas e sempre as primeiras duas amostras são correspondentes a sítios com periodontite e as duas últimas, a sítios com gengivite.

TABELA 1  
Frequência dos vírus EBV-1 e HCMV na população estudada.

Pacientes	Nº		Amostras	
	Periodontite		Gengivite	
1	1	2	3	4
2	5	6	7	8
3	9	10	11	12
4	13	14	15	16
5	17	18	19	20
6	21	22	23	24 *
7	25 *	26 *	27	28 *
8	29 *	30 *	31	32
9	33	34 *	35	36
10	37	38 *	39 *	40
11	41	42	43 *	44
12	45 *	46 *	47	48
13	49 *	50 *	51 *	52 *
14	53 *	54 *	55 *	56
15	57 *	58 *	59	60
16	61 *	62 *	63 *	64 *
17	65 *	66 *	67 *	68 *
18	69 *	70 *	71	72 *
19	73 *	74	75 *	76
20	77 *	78 *	79 *	80
21	81 *	82	83 *	84 *
22	85 *	86 *	87 *	88 *
23	<u>89 # *</u>	90	91	92
24	93	94 *	<u>95 #</u>	96
25	97 *	98	99	100
26	101 *	102	103	104
27	105	106 *	107	108
28	109	110	111	112
29	113 *	114	115	116
30	117	118	119	120

\* Amostras positivas para EBV-1

# Amostras positivas para HCMV



Na população do estudo, duas amostras (1,67%) foram positivas para o HCMV e cinquenta e três delas (44,2%) foram positivas para o EBV-1. Somente um sítio exibiu infecção mista pelos dois vírus testados (GRÁF. 4).

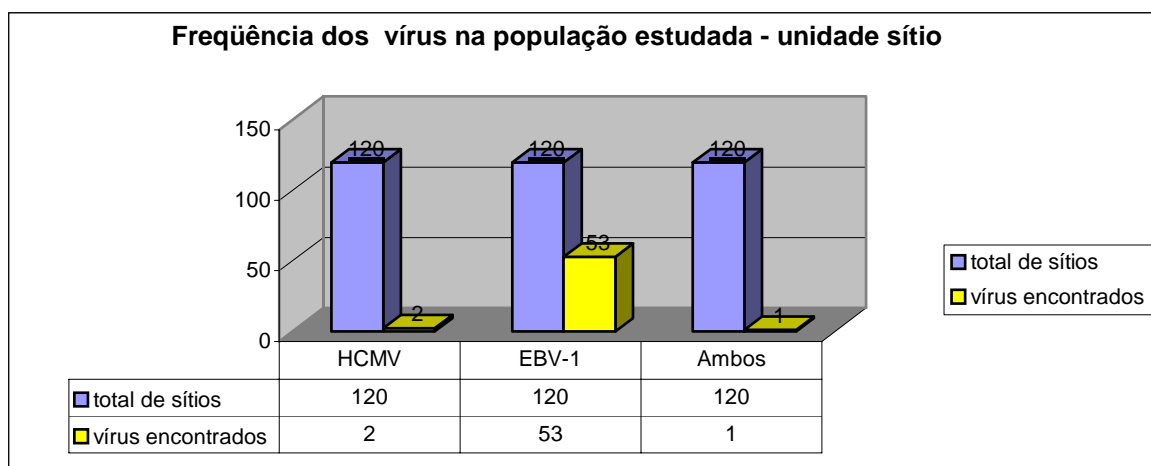


GRÁFICO 4 - Frequência dos vírus HCMV e EBV-1 na população estudada- unidade sítio

Considerando como unidade o indivíduo, em 23 (77%) deles foi detectado o EBV-1 e em 2 deles (6%) foi detectado o HCMV (GRÁF. 5).

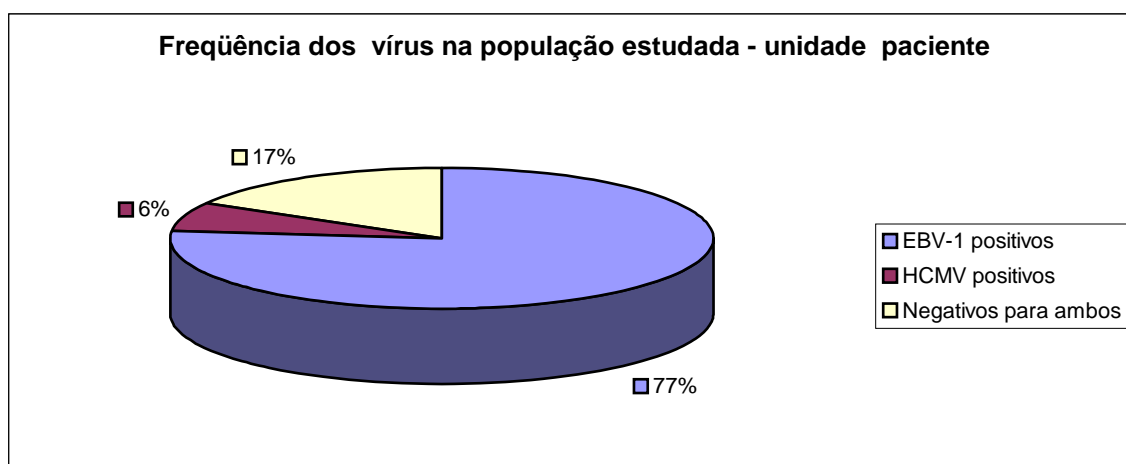


GRÁFICO 5 - Frequência dos vírus HCMV e EBV na população estudada – unidade paciente

### 6.3 EBV e doença periodontal

Num total de 60 amostras de gengivite, 19 delas foram positivas para o EBV-1, enquanto que nas 60 amostras de periodontite, 34 foram positivas para o mesmo vírus. Considerando o paciente como a unidade trabalhada, 23 deles se mostraram infectados pelo EBV-1. Sete dos pacientes pesquisados foram negativos para o vírus.

Quando avaliamos a positividade nos dois sítios de gengivite e nos dois de periodontite, seis pacientes tiveram seus dois sítios de gengivite infectados pelo EBV-1, enquanto que 13 pacientes tiveram os dois sítios de periodontite infectados pelo vírus.

A distribuição das amostras positivas para o EBV-1 nos sítios com gengivite e periodontite foi relacionada na TAB.2. Os resultados, embora não sejam estatisticamente significantes, mostram tendência para a presença do EBV-1 na periodontite.

TABELA 2

Teste do Qui-Quadrado realizado considerando os sítios positivos e negativos para o EBV-1

	<b>EBV-1 +</b>	<b>EBV-1 -</b>
Gengivite	19	41
Periodontite	34	26

Graus de liberdade = 1 (p) = 0.0371 Correção de Yates = 3.326

(p) = 0.0682

IC 95%: 1.0533 A 8.8390

Como as amostras foram pareadas, a presença do EBV-1 nos sítios com gengivite e periodontite foi também submetida aos testes de McNemar e dos Sinais. Na análise de McNemar (TAB.3), observamos que houve relação estatisticamente significativa entre a presença do vírus EBV-1 e os sítios com periodontite ( $p= 0,043$ ).

TABELA 3

Teste de McNemar realizado considerando os pacientes positivos e negativos para o EBV-1

Teste de McNemar	EBV + em periodontite	EBV – em periodontite
EBV+ em gengivite	11	2
EBV– em gengivite	10	7

(p)=0,043

Como o Teste de McNemar apresenta maior validade quando o n dos discordantes (+ e -) é  $>20$ , e na amostra o n dos discordantes foi de apenas 12 (2 +- e 10 - +), realizamos também o Teste dos Sinais. Neste teste, a relação positiva entre a presença do vírus EBV-1 nos sítios com periodontite foi confirmada ( $p= 0,0002$ ).

Os dados relacionados à presença do vírus EBV-1 nos sítios com gengivite e periodontite segundo o gênero do paciente encontram-se na TAB.4. Os resultados mostram que os homens apresentaram um número maior de sítios de gengivite positivos para o EBV-1 do que as mulheres. Analisando os sítios de periodontite também foi constatado que o maior número de sítios positivos para o vírus ocorreu no gênero masculino.

TABELA 4

Distribuição das amostras positivas e negativas para o EBV-1 segundo o gênero dos pacientes

	EBV-1 +	EBV-1 -	Valor de p
<b>Ambos os sítios</b>			
Masculino	9	2	p = 0,685
Feminino	14	5	
<b>Sítios com gengivite</b>			
Masculino	8	3	p = 0,027
Feminino	5	14	
<b>Sítios com periodontite</b>			
Masculino	9	2	p = 0,025
Feminino	7	12	

Teste Exato de Fischer

Os dados sobre a presença do vírus EBV-1 nos sítios com gengivite e periodontite segundo a idade dos pacientes são apresentados na TAB. 5. Os resultados não mostram relação estatisticamente significativa entre os dados analisados.

TABELA 5

Distribuição das amostras positivas e negativas para o EBV-1 segundo a idade dos pacientes

	EBV +	EBV-1 -	Valor de p
<b>Ambos sítios</b>			
Menos 30 anos	9	1	p = 0,371
≥ 30 anos	14	6	
<b>Sítios de gengivite</b>			
Menos 30 anos	6	4	p = 0,255
≥ 30 anos	7	13	
<b>Sítios de periodontite</b>			
Menos 30 anos	9	1	p = 0,118
≥ 30 anos	12	8	

Teste Exato de Fischer

A TAB. 6 apresenta os dados relacionando a presença do EBV-1 e a condição de tratamento periodontal do paciente. A análise dos dados não mostrou relação estatisticamente significativa entre esses parâmetros.

TABELA 6

Distribuição das amostras positivas e negativas para o EBV-1 segundo a condição de tratamento periodontal do paciente

	EBV-1 +	EBV-1 -	Valor de p
<b>Ambos sítios</b>			
Não tratados	14	4	p = 0,999
Tratados	9	3	
<b>Sítios com gengivite</b>			
Não tratados	10	8	p = 0,141
Tratados	3	9	
<b>Sítios com periodontite</b>			
Não tratados	13	8	p = 1
Tratados	8	4	

#### 6.4 HCMV e doença periodontal

Num total de 60 amostras de gengivite e 60 de periodontite, somente uma amostra de cada grupo foi positiva para o HCMV. Considerando o paciente como unidade trabalhada, 2 (6%) deles se mostraram infectados pelo vírus.

O teste de McNemar foi realizado com o intuito de responder se há diferença estatisticamente significativa quanto à presença do HCMV entre os sítios de gengivite e os de periodontite (TAB. 7), considerando como unidade o paciente. Os resultados não mostraram relação entre a presença desse vírus e a forma clínica de doença periodontal. Também não houve diferença estatisticamente significativa entre a presença do vírus nos dois sítios avaliando através do teste Exato de Fischer (TAB.8).

TABELA 7

Teste de McNemar realizado considerando os pacientes positivos e negativos para o HCMV

	HCMV + na periodontite	HCMV - na periodontite
HCMV + na gengivite	0	1
HCMV – em gengivite	1	28

p = 0,479

TABELA 8

Teste Exato de Fischer considerando sítios positivos e negativos para o HCMV

	HCMV +	HCMV -
Periodontite	1	59
Gengivite	1	59

p(unilateral)= 0,752      p(bilateral)= 1

Os dados relacionados à presença do vírus HCMV nos sítios com gengivite e periodontite segundo o gênero do paciente encontram-se na TAB.9. Os resultados também não mostraram dados estatisticamente significativos.

TABELA 9

Distribuição das amostras positivas e negativas para o HCMV segundo o gênero do paciente

	HCMV+	HCMV-	Valor de p
<b>Ambos os sítios</b>			
Masculino	0	11	p = 0,519
Feminino	2	17	
<b>Sítios com gengivite</b>			
Masculino	0	11	p = 1
Feminino	1	18	
<b>Sítios com periodontite</b>			
Masculino	0	11	p = 1
Feminino	1	18	

Teste Exato de Fischer



Para investigar a relação entre a presença do vírus HCMV e a idade do paciente, foi realizado o Teste exato de Fischer. Também foram avaliados os sítios em conjunto e os sítios separadamente (TAB.10). A análise dos dados não mostrou relação entre os parâmetros analisados.

TABELA 10

Distribuição das amostras positivas e negativas para o HCMV segundo a idade do paciente

	HCMV +	HCMV -	Valor de p
<b>Ambos sítios</b>			
Menos 30 anos	1	9	p = 1
≥ 30 anos	1	19	
<b>Sítios de gengivite</b>			
Menos 30 anos	1	9	p = 0,333
≥ 30 anos	0	20	
<b>Sítios de periodontite</b>			
Menos 30 anos	0	10	p = 1
≥ 30 anos	1	19	

Os dados sobre a presença do vírus HCMV nos sítios com gengivite e periodontite segundo a condição de tratamento periodontal dos pacientes são apresentados na TAB.11. A análise não mostrou uma diferença estatisticamente significativa entre esses parâmetros.

TABELA 11

Distribuição das amostras positivas e negativas para o HCMV segundo a condição de tratamento periodontal do paciente

	HCMV +	HCMV -	Valor de p
<b>Ambos sítios</b>			
Não tratados	0	18	p = 0,151
Tratados	2	10	
<b>Sítios com gengivite</b>			
Não tratados	0	18	p = 0,4
Tratados	1	11	
<b>Sítios com periodontite</b>			
Não tratados	0	18	p = 0,4
Tratados	1	11	

Teste Exato de Fischer

## 7 DISCUSSÃO

Em oposição aos achados de Ling et al. (2004) que relataram que a presença dos vírus estava igualmente distribuída entre os gêneros, encontramos que os pacientes do gênero masculino apresentaram maior número de sítios EBV-1 positivos, tanto na gengivite quanto na periodontite. Isto pode ser explicado parcialmente pelo fato da transmissão do EBV-1 se dar através de saliva, coincidindo com a iniciação precoce dos meninos – em relação ao beijo - comparados às meninas. Devemos também considerar este dado como consequência do pequeno número de amostras.

Quanto à idade do paciente, não encontramos associação de nenhuma faixa etária com a presença de EBV-1 ou HCMV. Poucos estudos descreveram sobre tal tópico, mas dois relataram que a presença dos vírus não mostrou predileção em relação à idade (TING et al., 2000 e LING et al., 2004) e dois que associaram a presença dos vírus a pacientes mais velhos (CONTRERAS et al., 1999a; PARRA & SLOTS, 1996).

Quando aventamos a relação entre a presença do vírus EBV-1 e a ocorrência ou não de tratamento periodontal, estávamos nos orientando com os resultados obtidos por Hanookai et al.(2000), que detectaram um decréscimo dos sítios positivos para esse vírus e de Saygun et al.(2004 b) que relatam a ausência total dos vírus nos sítios anteriormente infectados após o tratamento periodontal. No entanto, a análise do nosso trabalho não mostrou uma relação estatisticamente significativa entre esses parâmetros.

No nosso estudo, o EBV-1 foi detectado em frequência maior nas lesões de periodontite em comparação aos sítios com gengivite. Houve diferença estatisticamente significativa entre os sítios positivos e negativos para a presença do vírus em relação à profundidade de sondagem aumentada. Este resultado está de acordo com estudos anteriores que também evidenciam forte associação entre a presença do vírus e os sítios com periodontite (PARRA & SLOTS, 1996; CONTRERAS et al., 1999a ; 2000 ; HANOOKAI et al., 2000; TING et al., 2000; SAYGUN et al. 2002; LING et al., 2004; SAYGUN et al., 2004a; 2004b.)

O EBV-1 foi detectado em 23 indivíduos (77%), sendo o vírus mais prevalente nesta pesquisa. Este vírus é um potente ativador policlonal de linfócitos B e é capaz de induzir a proliferação e diferenciação de células secretoras de imunoglobulinas (ROSEN et al, 1977). A ativação, proliferação e diferenciação de linfócitos B estão associadas à progressão da doença periodontal (SEYMOUR, 1987; GEMMEL & SEYMOUR, 2004). De acordo com Celenligil & Ebersole (1997), a infecção por EBV pode induzir uma mudança nas subpopulações de linfócitos B, aumentando a relação de linfócitos B e plasmócitos/ monócitos. Além disto, os linfócitos infectados por EBV-1 podem compartilhar antígenos estruturais do vírus o que resulta na ativação de células T- supressoras (TAGA et al., 1995). Além desta atividade, herpesvírus também altera o número de linfócitos T. Conforme os achados de Rickinson & Kieff (1996) e Stashenko et al. (1987), o EBV induz a uma proliferação exacerbada de linfócitos T, cuja atividade está relacionada ao reconhecimento e destruição de células infectadas pelo vírus. Na doença periodontal uma disfunção imune mediada pela infecção por EBV favorece a proliferação subgengival de bactérias periodontopáticas (CONTRERAS et al., 1999). O que é muito interessante, é que o EBV-1 codifica uma proteína – BRCF-1 - que apresenta estrutura e função similares à da IL-10, que é capaz de

suprimir a secreção de IL-2 e IFN- $\gamma$  polarizando o sistema imune à uma resposta Th2 (ROSEN et al., 1977). De acordo com Seymour (1987), justamente este tipo de resposta -Th2- está associada à progressão da doença periodontal.

No nosso estudo, houve a detecção de vírus também em sítios rasos, com gengivite, contrastando com os achados de Hanoikai et al. (2000) e Kubar et al. (2004), que não detectaram EBV-1 nem o HCMV nos sítios sem perda de inserção.

A não detecção significativa de HCMV na nossa amostra contrasta, e muito, com estudos anteriores que detectaram o vírus com maior frequência nos sítios com periodontite (CONTRERAS & SLOTS, 1998; MICHALOWICZ et al., 2000; KUBAR et al., 2004). Na verdade, o HCMV apresenta taxas menores de prevalência do que o EBV-1. Além disto, o tamanho da população do estudo, diferenças étnicas ou a própria seleção desta população podem ser responsáveis por estas variações.

O nosso trabalho se diferencia da grande maioria com o próprio paciente formando o grupo controle. Todos os trabalhos anteriores compararam a presença do vírus entre indivíduos diferentes [com periodonto sadio e indivíduos com periodontite], com exceção de Contreras et al. (1999b); Contreras et al. (2000); Hanoikai et al. (2000) e Ting et al. (2000). Pensamos que realizando o auto-pareamento podemos anular variáveis como sistema imune e stress do hospedeiro, fatores que interferem na replicação viral. Desta maneira, pode-se começar a elucidar porque num mesmo indivíduo alguns sítios progridem para a perda de inserção enquanto outros experimentam a gengivite por anos, sem progressão para a periodontite.

Sobre a metodologia do estudo, algumas considerações têm que ser feitas:

a) Apesar da técnica de PCR apresentar uma alta sensibilidade, ainda sim poderia se acreditar no fato das pontas de papel absorvente não terem sido o suficiente para coletar células infectadas pelos vírus no fluido do sulco/ bolsa, culminando numa presença subestimada dos vírus. No entanto, com o cuidado de realizar a PCR para a  $\beta$ -globina esses efeitos foram minimizados.

b) Não está no escopo do nosso estudo avaliar a seqüência temporal da infecção herpética. Muitos autores acrescentam que faltam estudos longitudinais e microbiológicos para estabelecer a relação entre a infecção por herpes e a doença periodontal progressiva (CONTRERAS & SLOTS, 1998; MARDIROSSIAN et al., 2000) ou a tipos necrosantes de doenças periodontais associada ao HIV (CONTRERAS et al., 2001). De fato, Michalowickz et al., (2000) observaram que nenhum dos estudos avaliou a seqüência temporal do início da infecção viral e da colonização bacteriana nos indivíduos da pesquisa. Para tanto, exigir-se-ia uma monitoração longitudinal microbiana e sorológica (MICHALOWICKZ et al., 2000; TING et al., 2000). Sabendo das limitações do nosso trabalho, por não se tratar de um estudo longitudinal, fica difícil saber se os vírus constituem um importante fator de risco para o posterior desenvolvimento da doença periodontal ou se a presença deles seja puramente secundária ao infiltrado inflamatório decorrente da gengivite. No entanto, a despeito de quem chegou primeiro, é possível que haja um importante sinergismo entre os herpesvírus e as bactérias subgengivais.

c) Por este presente estudo apresentar um resultado dicotômico, através da metodologia aplicada não podemos diferenciar se sítios que estão em atividade de doença periodontal

correspondem àqueles que exibem maior número de vírus. Estudos posteriores que encontrem níveis elevados de herpesvirus nos sítios em atividade comparados com baixos níveis de vírus nos sítios quiescentes enfatizariam o caráter periodontopatogênico desses microrganismos.

Diante do exposto, ficam apresentados os seguintes fatores como os principais responsáveis pelo enquadramento dos herpes vírus na etiopatogênese da doença periodontal humana:

- a) detecção de ácido nucléico e de seqüências de EBV-1, HCMV e outros tipos de herpes vírus nas lesões periodontais de adultos e adolescentes;
- b) associação entre a GUNA em crianças Nigerianas desnutridas e herpes vírus;
- c) aparente associação entre a expressão de RNAm detectada nas lesões periodontais e a progressão da doença;
- d) o aumento do número de bactérias periodontopatógenas nas lesões onde foram detectados vírus;
- e) o provável papel imunossupressor do vírus sobre as células do periodonto;
- f) presença de ácido nucléico do herpes nas células inflamatórias do periodonto;
- g) capacidade do herpes vírus em aumentar a expressão de citocinas que medeiam a destruição tecidual. (CONTRERAS & SLOTS, 2000)

No que concerne à análise dos fatos, Contreras & Slots (2000) apresentaram uma explicação sobre o provável mecanismo dos vírus na periodontite. Eles sugerem que alguns tipos de vírus diminuem a resistência do tecido periodontal, permitindo a multiplicação de bactérias periodontogênicas. A reativação herpética no tecido causa uma imunossupressão temporária o

que explica, em parte, a natureza progressiva e episódica da doença. O tropismo tecidual que os herpes vírus apresentam pode ajudar a explicar o padrão localizado da periodontite. A ausência de infecção por herpes vírus ou o seu estado latente (não reativação) seria a razão pela qual indivíduos que abrigam as bactérias periodontopáticas permaneçam saudáveis do ponto de vista periodontal.

Neste sentido, se alguns tipos de doença periodontal são realmente causadas por infecção bacteriana oportunista mediada por infecção herpética, uma nova medida quanto à prevenção e ao tratamento da periodontite seria focalizar no controle destes vírus que capacitam o aumento do número das bactérias periodontopatógenas (CONTRERAS et al., 1999 a; CONTRERAS & SLOTS 2000). Se isto for verdade, o tratamento direcionado aos vírus do herpes, incluindo vacinas para o HCMV e para o EBV, poderia ser eficazmente empregado na prevenção e tratamento da doença periodontal destrutiva (CONTRERAS & SLOTS, 2000; SLOTS & CONTRERAS, 2000). O entendimento sobre a influência dos papéis dos vírus e bactérias na patogênese da periodontite talvez ajude a explicar as características da doença e a identificar pessoas que apresentam um alto risco à destruição periodontal (SAYGUN et al., 2004).

A associação entre a doença periodontal e infecção por herpes pode ser um reflexo da característica imuno-inflamatória alterada do hospedeiro, a qual coloca o paciente sob risco para ambas as condições. Dados de vários estudos sugeriram que mesmo a infecção herpética não sendo o mecanismo causal primário para a doença periodontal, pode contribuir para a morbidade da condição. Assim, a afirmação mais plausível é que a infecção herpética pode ser um indicativo de susceptibilidade para a periodontite.



Embora haja evidências circunstanciais do papel dos herpes vírus na periodontite, uma relação causa-efeito deve ser melhor estabelecida (PARRA & SLOTS, 1996; CONTRERAS & SLOTS, 1998; CONTRERAS et al., 1999 a ; CONTRERAS et al., 1999 b; CONTRERAS et al., 2000; SLOTS & CONTRERAS, 2000; MARDIROSSIAN et al., 2000; HANOOKAI et al., 2000; MICHALOWICZ et al., 2000; TING et al., 2000; CONTRERAS et al., 2001).

Embora os nossos dados não permitam afirmar definitivamente uma relação causal entre o EBV e a doença periodontal, ajudam a consolidar a hipótese de que esse vírus pode estar envolvido na evolução da doença. A confirmação desta hipótese trará importantes implicações tanto no diagnóstico quanto no tratamento da doença periodontal.

## 8 CONCLUSÕES

Através deste estudo podemos concluir que:

- 1- O vírus EBV-1 é encontrado com maior frequência em sítios com periodontite.
- 2- O vírus HCMV é raramente encontrado em sítios com gengivite e periodontite.
- 3- Encontrou-se uma maior frequência do EBV-1 do que HCMV nas lesões periodontais de nossos participantes.

## REFERÊNCIAS

ABRAMSON, J.S.; WHEELER, J.G. Virus induced neutrophil dysfunction: role in the pathogenesis of bacterial infections. *Pediatr Infect Dis J*. Chicago, v. 13, n.7, p.643-652, 1994.

ALLEN,W.P.; HITCHCOCK,P.J. Preface: herpesvirus vaccine workshop. *Rev. Infect Dis* ,Chicago,v.13, suppl.11, S891, 1991.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. *J Mol. Biol.*, v.215, p.403-10, 1990.

AMIT, R.; MORAG, A.;RAVIDZ, Z.; et al. Detection of herpes simplex virus in gingival tissue. *J Periodontol*. Chicago, v. 63, n. 6, p. 502-6, June,1992.

AMMATUNA,P.; CAPONE, F.; GIAMBELLUCA, D.; PIZZO, I.; D'ALIA G.; MARGIOTTA, V. Detection of Epstein Barr virus (EBV) DNA and antigens in oral mucosa of renal transplant patients without clinical evidence of oral hairy leukoplakia (OHL). *J Oral Pathol Med* , Copenhagen, v. 27, p. 420-7, 1998.

ANUSAKSATHIEN, O.; DOLBY, A.E. Autoimmunity in periodontal disease. *J Oral Path & Medic*, Copenhagen, V. 20, n. 3, p.101- 07, March, 1991.

ARBUSTINI, E.; GRASSO,M.; DIEGOLI,M.; PERCIVALLE,E.; BRAMERIOP,M.;CAMPANA,C.;GOGGI,C.;GAVAZZI,A.; VIGANO,M. Histopathologic and molecule profile of human cytomegalovirus infections in patients with heart transplants. *J Infect Dis*, Chicago, v. 98, n.2, p. 205-13, Aug, 1992.

AYRES, M.; JR. M. A.; AYRES, D. L.; DOS SANTOS, A. S. *BIOESTAT 3.0 – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Editora Sociedade civil Mamirauá: Belém, p. 291, 2003.

BASSAM, B. J.; CAETANO- ANNOLES, G.; GRESSHOFF, P. M.. Fast sensitive silver staining of DNA and in polyacrylamid gels . *Annal Biochem* 196, n. 1, p. 80-3, July, 1991.

BEERSMA, M. F.; BJILMAKERS, M. J.; PLOEGH, H. L. Cytomegalovirus down-regulates HLA class I expression by reducing the stability of class I H chains. *J Immunol*, Baltimore, v. 1151, n. 9, p. 4455-64, Nov., 1993.

BENEDICT, C. A.; BANKS, T. A.; SENDEROWICS, L.; KO, M.; ANGULO, A.; GHAZAL, P.; WARE, C. F. Lymphotoxins and cytomegalovirus cooperatively induce interferon-beta, establishing host-virus detente. *Immunity* .Cambridge, v. 15, n. 4, p. 617-626, Oct., 2001.

BIOESTAT 3.0 *Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Belém, Editora Sociedade Civil Mamirauã, Brasília – CNPq , 2003, 291p.

BOOM, R., SOL, C. I., SALIMANS, M. M.; JANSEM, C. L.; WERTHEIN-VAN DILLEN, E. M.; VAN de NOORDAA. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol*. v. 28, p. 495-503, 1990.

BRITT, W. J.; VUGLER, L.; BUTFILOSKI, E. J & STEPHENS, E. B. Cells surface expression of human cytomegalovirus (HCMV) gp 55-116(gB): use of HCMV – recombinant vaccinia virus infected cells in analysis of the human neutralizing antibody response. *J Virol*, Washington DC, v: 64, n. 3, p. 1079-1085, Mar, 1990.

CARLOS, R.; SEDANO, H. O. Multifocal papilloma virus epithelial hyperplasia. *Oral Surg Oral Pathol Oral Med*, St Louis, v. 78, n.6, p. 680, Dec., 1994.

CASSAI, E.; GALVAN, N.; TROMBELLI, L.; ROTOLA, A. HHV-6, HHV-7 and HHV-8 in gingival biopsies in chronic adult periodontitis patients. A case-control study. *J Clin Periodontol*, Copenhagen, v. 30, n. 3, p. 184-91, Mar, 2003.

CELENLIGIL, H.; EBERSOLE, J.L. Characteristics and responses of EBV immortalized B cells from periodontal disease patients. *Oral Dis*, Copenhagen, v. 3, n. 4, p. 262-71, Dec., 1997.

CONTRERAS, A.; NOWZARI, H.; SLOTS, J. Herpesviruses in periodontal pocket and gingival tissue specimens. *Oral Microbiol and Immunol*. Copenhagen, v. 15, n. 1, p. 15, Feb., 2000.

CONTRERAS, A.; SLOTS, J. Herpesviruses in human periodontal disease. *J Periodontol Res*. Copenhagen, v. 35, n. 1, p. 3-16, Feb., 2000.

CONTRERAS, A.; UMEDA, M.; CHEN, C.; BAKKER, I.; MORRISON, J.L.; SLOTS, J. Relationship between herpesviruses and adult periodontitis and periodontopathic bacteria. *J Periodontol*. Chicago, v. 70, n. 5, p. 478-484, May, 1999a.

CONTRERAS, A.; ZADEH, H.H.; NOWZARI, H.; SLOTS, J. Herpesvirus infection of inflammatory cells in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*. Copenhagen, v. 14, n. 4, p. 206-212, Aug., 1999 b

CONTRERAS, A.; FALKER, W. A. Jr.; ENWONWU C.O.; IDIGBE, E. O.; SAVAGE, K. O.; AFOLABI, M.B.; ONWUJEKWE, D.; RAMS, T.E.; SLOTS, J. Human herpesviridae in acute necrotizing ulcerative gingivitis in children in Nigeria. *Oral Microbiol Immunol*. Copenhagen, v. 12, n. 5, p. 259 - 265, Oct., 1997.

CONTRERAS,A.; SLOTS,J. Active cytomegalovirus infection in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*. Copenhagen, v. 13, n. 4, p. 225-230, Aug., 1998.

CONTRERAS,A.; SLOTS,J. Mammalian viruses in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*. Copenhagen, v. 11, n. 6, p. 381-386, Dec., 1996.

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

COSTA,L.J.;SILVEIRA,F.R.;BATISTA,J.M.;BIRMAN,E.G.Human papilloma virus--its association with epithelial proliferative lesions. *Braz Dent J*. Ribeirão Preto, v. 5, n.1, p. 5-10, 1994.

COYLE, P. V., WYATT, D. E., ONG, G. M., MAXWELL, A. P., McCAUGHEY, H. J., O'NEILL, H. J. A nested primer set targenting the cytomegalovirus glycoprotein B gene. *Journal of Clinical Virology*, v.25, p.95-96, 2002.

D' COSTA,J.; SARANATH,D.; SAGHVI,V.; MEHTA,A.R. Epstein-Barr virus in tobacco-induced oral cancers and oral lesions in patients from Índia. *J Oral Pathol Med*, Copenhagen, v. 27, n. 2, p. 78-82, Feb., 1998.

DODD,C.L.;WINLER,J.R.;EINIC,G.S;DANIELS,T.E.;YEE,K.;GRRENSPAN,D.  
Cytomegalovirus infection presenting as acute periodontal infection in a patient infected with the human immunodeficiency virus. *J Clin Periodontol*, Copenhagen, v. 20, n.4, p.282-285, Apr., 1993.

EHRlich,J.; COHEN,G.H.; HOCHMAN,N. Specific herpes simples virus antigen in human gingiva. *J. Periodontol*. Chicago, v. 54, n. 6, p. 357-360, Jun., 1983.

FLAMAND,L.; STEFANESCU,I.; ABLASHI, D.V.; MENEZES,J. Activation of the Epstein-Barr virus replicative cycle by human herpes virus 6. *J Virol*, Washington DC, v. 67, n. 11, p. 6768-777, Nov., 1993.

FRANÇA, JÚNIA LESSA. *Manual para normalização de publicações tecno-científicas*. 7ed, Belo Horizonte, Ed. UFMG, 2004.

FUJII,N.;OGUMA,K.;YOKOSAWA,N.;KIMURA,K.;TSUZUKI,K. Characterization of bacteriophage nucleic acids obtained from Clostridium botulinum types C and D. *Appl.Environ.Microbiol.* Washington DC, v. 54, n.1, p. 69-73, Jan.,1988.

GARLICK,J.A.; CALDERON,S.; BUCHNER,A.; MITRANI-ROSENBAUM,S. Detection of human papillomavirus (HPV) DNA in focal epithelial hyperplasia. *J Oral Pathol Med*, Copenhagen, v. 18, n. 3, p. 172-177, Mar.,1989.

GEMMEL, E.; SEYMOUR, G.J. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontology 2000*, Copenhagen, v. 35, p.21-40, 2004.

GOZLAN, J.; SALORD,J.M.; CHOUAID.C. ETAL. Human cytomegalovirus (HCMV) late mRNA detection in peripheral blood of AIDS patients: diagnostic value for HCMV disease compared with those of viral culture and HCMV DNA detection. *J Clin Microbiol*, Washington DC, v. 31, n. , p. 1943-45, July, 1993.

GREENSPAN,D.; deVILLIERS,E.M.; GREENSPAN,J.S.; de SOUZA, Y.G.; zur HAUSEN,H. Unusual HPV types in oral warts in association with HIV infection. *J Oral Pathol*, Copenhagen, v. 17,n. 9/10, p. 482-488, Nov., 1988.

GREENSPAN,J.S.; GREENSPAN,D. Oral hairy leukopakia: diagnosis and treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, St Louis, v.67, n. 4, p.396-403,Apr.,1989.

GRIFFITHS, P.D. Herpesviruses and AIDS. *Scand J Infec Dis*, v.100, S3- S, 1996.

HAMILTON, J.R.; OVERALL, J.C.; GLASGOW, L.A. Synergistic effect on mortality in mice with murine cytomegalovirus and pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, or candida albicans infections. *Infect Immun*, Washington DC, v. 14, n.4, p. 982-89, Oct., 1976.

HANOOKAI, D.; NOWZARI, H.; CONTRERAS, A.; MORRISON, J.L.; SLOTS, J. Herpesviruses and periodontopathic bacteria in Trissomy 21 periodontitis. *J Periodontol*, Chicago, v. 71, n.3, p. 376-384, Mar, 2000.

HENKE, R.P.; GUERIN-REVERCHON, I.; MILDE-LANGOSCH, K.; KOPPANG, H.S.; LONING, T. In situ detection of human papillomavirus types 13 e 32 in focal epithelial hyperplasia of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med*, Copenhagen, v. 18, n.7, p.419-421, Aug., 1989.

HEURLIN, N.; BRATTSTROM, C.; LONNQVIST, B. ; ET AL. Aetiology of pulmonary diseases in immunocompromised patients. *Euro Resp J*, Copenhagen, v.4, n.1, p. 10-18, Jan, 1991.

HIGA, M.; KINJO, T.; KAMIYAMA, K.; IWAMASA, T.; HAMADA, T.; IYAMA, K. Epstein-Barr virus (EBV) subtype in EBV related oral squamous cell carcinoma in Okinawa, a subtropical island in southern Japan, compared with Kitakyushu and Kumamoto in mainland Japan. *J Clin Pathol*, Londres, v. 55, n. 6, p. 414-423, Jun., 2002.

HILLMAN, J.D.; SOCRANSKY, S.S. Bacterial interference in the oral ecology of *Aa* and its relationship to human periodontitis. *Arch Oral Biol*, Oxford, v. 27, n. 1, p. 75-77, 1982.

HOLT, S. C.; PROGULSKE, A. Microbiologia geral, metabolismo e genética. In: NISENGARD, R. J.; NEWMAN, M. G. *Microbiologia Oral e Imunologia*. 2ª ed. RJ: Guanabara Koogan, 1997, cap. 3, p. 40-97.



HOOKS,J.J. Possibility of a viral etiology in recurrent aphthous ulcers and Behcet's syndrome. *J Oral Pathol* , Copenhagen, v. 7,n.6, p. 353-364, Dec., 1978.

IDESAWA ,M.; SUGANO, N.; IKEDA, K.; OSHIKAWA,M.; TAKANE,M.; SEIKI, K.; ITO, K.Detection of Epstein-Barr virus in saliva by real time PCR. *Oral Microbol Immunol*. Copenhagen, v. 19 , n. 4 , p. 230-232, Aug, 2004.

ISBERG,R.R.; FALKOW,S. A single genetic locus encoded by *Yersinia pseudotuberculosis* permits invasion of cultured animal cells by *Escherichia coli* K-12. *Nature*, London, v. 317, n. 6034, p. 262-264, Sep., 1985.

ITO, M.; WATANABE, M.; IHARA, T.; KAMIYA, H.; SAKURAY,M. Increased expression of adhesion molecules ( CD 29, CD54, CD44) on fibroblasts infected with cytomegalovirus. *Microbiol Immunol*, Tokyo, v. 39, n. 2, p. 129-133, 1995.

IWAMOTO, G.K.; MONICK,M.M; CKARCK,B.D.; AURON,P.E.; STINSKI,M.F.; HUNNINGHAKE,G.W. Modulation of interleukin 1 beta gene expression by the immediate early genes of human cytomegalovirus. *J Clin Invest*, Thorofare, v. 85, n. 6, p. 1853-1857, June, 1990.

JANG, H.S.; CHO,J.O.; YOON,C.Y.; KIM,H.J.; PARK,J.C. Demonstration of Epstein-Barr virus in odontogenic and nonodontogenic tumors by the polymerase chain reaction (PCR). *J Oral Pathol Med*, Copenhagen, v. 30, n. 10, p. 603-610,Nov., 2001.

JIMENEZ,C.;CORRENTI,M.;SALMA,N.; CAVAZZA,M.E.; PERRONE,M. Detection of human papillomavirus DNA in benign oral squamous epithelial lesions in Venezuela. *J Oral Pathol Med*, Copenhagen, v. 30, n.7, p. 385-388, Aug., 2001.

KAMMA, J.J.; CONTRERAS,A.; SLOTS.J. Herpesviruses and periodontopathic bacteria in early- onset periodontitis. *J Clin Periodontol*, Copenhagen, v.28, n. 9, p. 879-885, Sep.,2001.

KAPASI,K.; RICE,G.P.A. Cytomegalovirus infection of peripheral blood mononuclear cells: effects of interleukin-1 and 2 production and responsiveness. *J Virol*, Washington DC, v. 62, p. 3603-13, 1988.

KELLEY,K.W. Growth hormone, lymphocytes and macrophages. *Biochem Pharmacol*, Headington Hill Oxford, v. 38, n. 5, p. 705 - 713, March ,1989.

KUBAR, A.; SAYGUN, I.; OZDEMIR, A.; YAPAR, M.; SLOTS, J. Real time polymerase chain reaction quantification of human Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in periodontal pockets and the adjacent gingiva of periodontitis lesions. *J Period Res* , Copenhagen, v. 40 , n. 2 , p. 97-104 , April , 2005.

KUBAR, A.; SAYGUN, I.; YAPAR, M; OZDEMIR, A; SLOTS, J. Real time PCR quantification of cytomegalovirus in aggressive periodontitis lesions using Taq Man technology. *J Periodont Res*. Copenhagen, v. 39, n. 2 , April, 2004

LANG,N. P.; JOSS, A.; TONETTI, M.S. Monitoring disease during supportive periodontal treatment by bleeding on probing. *Periodontol 2000*, Copenhagen , v. 12, p. 44-48. Oct., 1996

LANGFORD,A.;KUNZE,R.;TIMM,H.; RUF,B.;REICHERT,P. Citomegalovirus associated oral ulcerations in HIV patients. *J Oral Pathol Med*, Copenhagen, v. 19, n. 2, p. 71-76, Feb., 1990.

LING, LI-JANE; CHUAN-CHEN HO; CHING-YI WU; YEN-TING CHEN; SHAN-LING HUNG. Association between human herpesviruses and the severity of periodontitis. *J Periodontol*. Chicago, v. 75 , n. 11, p. 1479-1485, Nov., 2004

MACKOWIACK, P. A.; MARLING-CARSON,M.; SMITH,J,W,; LUBY,J.P. Antibody mediated bacterial adhesion to cytomegalovirus-induced Fc receptors. Potential relationship to secondary infections complicating herpesviruses infections. *J Clin Invest*, Thorofare, v. 73, n.4, p. 987-991, Apr., 1984.

MADIANOS,P.N.; PAPAPANOU,P.N.; SANDROS, J. *Porphyromonas gingivalis* infection of oral epithelium inhibits neutrophil transepithelial migration. *Infect Immun*, Washington DC, v. 65, n. 10 , p. 3983-90, Oct., 1997.

MAO,E.J.; SMITH,C.J. Detection of Epstein-Barr virus (EBV) DNA by the polymerase chain reaction (PCR) ion oral smears from healthy individuals and patients with squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, Copenhagen, v. 22, n. 1, p. 12-17, Jan. 1993.

MARDIROSSIAN,A.; CONTRERAS, A.; NAVAZESH,M.; NOWZARI,H.; SLOTS,J. Herpesviruses 6, 7 and 8 in HIV and non-HIV-associated periodontitis. *J Periodont Res*, Copenhagen, v. 35, n. 5, p. 278-284, Oct., 2000.

Mc DONALD,S.E.; NOWZARI,H.; CONTRERAS,A.; FLYNN,J.;MORRISON,J.; SLOTS,J. Clinical and microbiological evaluation of a bioabsorbable and a nonresorbable barrier membrane in the treatment of periodontal intraosseous lesions. *J Periodontol*, Chicago, v. 69, n. 4, p. 445-453, Apr., 1998.

MEYERS,J.D.; FLOURNOY,N.; THOMAS,E.D. Risk factors for cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation. *J Infect Dis*, Chicago, v. 153, n. 3, p. 478-488, Mar.,1986.

MICHALOWICZ, B. S.; RONDEROS, M.; CAMARA-SILVA,R.; CONTRERAS, A. Human herpesviruses and *Porphyromonas gingivalis* are associaates with juvenile periodontitis. *J Periodontol*, Chicago, v. 71, n. 6, p. 981-988, 2000.

NEWMAN,M.G.; NISENGARD,R.J. *Microbiologia oral e imunologia*. Segunda edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 395p.

OGAWA Y, FUJITA H, MATSUOKA H, KOMATSUBARA J, HORI T, KANEKO N, TSUDA T, YUGE A.. Isolation of herpes simplex virus from patients with periodontal disease. *Nippon Shishubyo Gakkai Kaishi*. v. 24, n. 4, p. 594-600 ,Dec,1982.

PADAYACHEE, A.; van WYK, C.W. Human papillomavirus (HPV) DNA in focal epithelial hyperplasia by in situ hybridization. *J Oral Pathol Med*, Copenhagen, v.20, n.5, p. 210-214, May, 1991.

PAGE, R.C.; OFFENBACHER,S.; SCHROEDER; SEYMOUR,G.J.; KORNMAN,K. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontology 2000*. Copenhagen, v.14, p. 216-248, 1997.

PARK,NO-HEE. Virologia. In: NEWMAN, M. G.; NISENGARD, R.J. *Microbiologia Oral e Imunologia*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. Cap. 22, p. 213 - 245.

PARRA, B.; SLOTS,J. Detection of human viruses in periodontal pockets using polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol*, Copenhagen, v.5, n.11 , p. 289 – 293, Oct. , 1996.

PEREIRA, MAURÍCIO GOMES. *Epidemiologia: teoria e prática*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. 596p.

PINA, S., JOFRE, J., EMERSON, S. U., PURCELL, R. H., GIRONE, 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*, v.64, n.11, p.4485-4488, 1998.

PORTER, S. R.; MUTLU, S.; SCULLY, C. M. Viral infections affecting periodontal health. *Periodontal Clin Invest*, v.15, n.1, p. 17-24, Fall, 1993.

REDPATH, S.; ANGULO, A.; GASCOIGNE, N.R.; GHAZAL, P. Murine cytomegalovirus infection down-regulates MHC class II expression on macrophages by induction of IL-10. *J Immunol*, Baltimore, v. 162, n.1 (11) , p. 6701- 07, June, 1999.

RICKINSON, A.B.; KIEFF, E. Epstein-Barr virus. In: FIELDS, B.N. KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M. *Fields Virology*. 3ed. Philadelphia : Lippincott-Raven, 1996 , v. 2, cap. 75, p. 2397-2445.

ROIZMAN, B. Herpesviridae. In: FIELDS, B.N. KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M. *Fields Virology*. 3 ed. Philadelphia : Lippincott-Raven, 1996 , v. 2, cap. 71, p. 2220-30.

RONES, Y.; HOCHMAN, N.; ERLICH, J.; ZAKAY RONES, Z. Sensitivity of oral tissues to herpes simplex virus *in vitro*. *J Periodontol*, Chicago, v. 54, n. 2 , p. 91-95, Feb., 1983.

ROSEN, A.; BERGELEY, P.; JONDAL, M.; ET AL. Polyclonal Ig production after Epstein-Barr virus infection of human lymphocytes *in vitro*. *Nature*, London, v.5, n. 267, p. 52-4, May, 1977.

ROSENSTEIN, D.I.; EIGNER, T.L.; LEVIN, M.P.; CHIODO, G.T. Rapidly progressive periodontal disease associated with HIV infection. *J Am Dent Assoc*, Chicago, v. 118, n. 3 , p. 313-4, Mar., 1989.

ROUSE, B.T.; HOROHOV, D.W. Immunossuppression in viral infections. *Rev Infect Dis*, Chicago, v. 8, n.6 , p. 850-73, Nov/De , 1986.

SABETI, M.; SIMON, J. H, SLOTS, J. Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus associated with symptomatic periapical pathosis. *Oral Microbiol Immunol*, Copenhagen, v. 18, n. 5, p. 327-8, Oct, 2003.

SAIKI, R.K.; GELFAND,D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF,S.J.; HIGUSHI,R.; HORN, G.T.;MULLIS, K. B.; ERLICH, H.A.. Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science*, v.29, n. 239, p. 487-91, Jan,1988.

SAIKI, R.K.; SCHARF,S.J.; FALOONA,F.; MULLIS,K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM,N. Enzimatic amplification of b globin sequences and restriction site analyses for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, v. 230, p. 1350-54, 1985.

SALVI,G.E.; LAWRENCE,H.P.; OFFENBACHER,S.; BECK,J.D. Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis. *Periodontology 2000*, Copenhagen, v.14, p.173-201, June, 1997.

SAMBROOK, J.;FITSH, E.F.; MANIATS,T. *Molecular cloning a laboratory manual*. Press cold Spring Habort, NY,1989.

SANTANGELO, R.; D'ERCOLE, S.; GRAFFEO, R.; MARCHETTI, S.; DELI, G.; NACCI, A.; PICCOLOMONI, R.; CATTANI, P.; FADDA, G. *New Microbiol* , v. 7,n. 2, p. 133-137, Apr, 2004.

SAYGUN, I.; KUBAR, A.; OZDEMIR, A.; YAPAR, M; SLOTS, J. Herpesviral –bacterial interrelationships in aggressive periodontitis. *J Periodont Res*, Copenhagen, v. 39, n. 4, p. 207-212, Aug, 2004 a

SAYGUN, I.; KUBAR, A.; OZDEMIR, A.; YAPAR, M; SLOTS, J. Periodontitis lesions are a source of salivary cytomegalovirus and Epstein Barr virus. *J Period Res*, Copenhagen, v. 40, n. 2 , p. 187-191, April , 2005.

SAYGUN, I.; SAHIN,S.; OZDEMIR, A.; KURTIS,B.;YAPAR, M.; KUBAR,A.; OZCAN, G. Detection of human viruses in patients with chronic periodontitis and the relationship between viruses and clinical parameters. *J Periodontol*, Chicago, v. 73, n. 12, p. 1437-43, Dec.,2002.

SAYGUN, I.; YAPAR, M.; OZDEMIR, A.; KUBAR, A.; SLOTS,J. Human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus type 1 in periodontal abscesses. *Oral Microbiol Imunnol*, Copenhagen, v.19, n.2 ,p. 83-87, April, 2004. b

SCULLY, C. New aspects of oral viral diseases. In: Seifert G. *Oral Pathology: actual diagnostic and prognostic aspects. Current topics in Pathology*. Berlin: Springer Verlag, 1996, v. 90, p. 29-96.

SCULLY,C.;EPSTEIN,J.;PORTER,S.;COX,M. Viruses and chronic disorders involving the human oral mucosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, St Louis, v. 72, n.5 , p. 537-544, Nov.,1991.

SEYMOUR,G.J. Possible mechanisms involved in the imunoregulation of chronic inflammatory periodontal disease. *J Dent Res*, Washington DC, v. 66, n.1, p. 2-9, Jan., 1987.

SJODIN, B.; CROSSNER, C-G.; UNELL, L.; OSTLUND, P. A retrospective radiographic study of alveolar bone loss in the primary dentition in patients with localized juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol*, Copenhagen, v. 16, n. 2 , p. 124-27, Feb., 1989.

SLOTS, J. , NOWZARY, H., SABETI, M. Cytomegalovirus infection in symptomatic periapical pathosis. *Int. Endod J*, Chicago, v. 37, p.519-524, 2004.

SLOTS, J. Update on human cytomegalovirus in destructive periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol*, Copenhagen, v. 19, n. 4, p. 217-223, Aug, 2004.

SLOTS, J.; CONTRERAS, A. Herpesviruses: a unifying causative factor in periodontitis? *Oral Microbiol Immunol*, Copenhagen, v. 15, n. 5, p. 277-280, Oct., 2000.

SLOTS, J.; SUGAR, C.; KAMMA, J. J. Cytomegalovirus periodontal presence is associated with subgingival *Dialister pneumosintes* and alveolar loss. *Oral Microbiol Immunol*, Copenhagen, v. 17, n. 6, p. 369-74, Dec., 2002.

SOHN, Y.M.; OH, M.K.; BALCAREK, K.B.; CLOUD, G.A.; PASS, R.F. Cytomegalovirus infection in sexually active adolescents. *J Infect Dis*, Chicago, v. 163, n. 3, p. 460-463, 1991.

STASHENKO, P.; FUJIYOSHI, P.; OBERNESSER, M. S.; PROSTAK, L.; HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S. Levels of interleukin 1 beta from sites of active periodontal disease. *J Clin Periodontol*, Copenhagen, v. 18, n.7, p. 548-554, Aug., 1991.

SYRJANEN, K.; HAPPONEN, R. P.; SYRJANEN, S.; CALONIUS, B. Human papillomavirus (HPV) antigens and local immunologic reactivity in oral squamous cell tumors and hyperplasias. *Scand J Dent Res*, Copenhagen, v.92, n.4, p. 358-37, Aug., 1984.

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*, Chicago, v. 171, n. 5, p. 1347-50, May, 1995.

TEMPRO, P. J. ; ZAMBON, J.J. Corynebacterium e Mycobacterium. In: NISENGARD, R.J.; NEWMAN, M. G. *Microbiologia oral e Imunologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, cap. 11, p.147-153.



TING, M.; CONTRERAS, A.; SLOTS, J. Herpesviruses in localized juvenile periodontitis. *J Periodont Res*, Copenhagen, v. 35, n. 1, p. 17-25, Feb., 2000.

TZUHAKO, K.; NAKAZATO, I.; MIYAGI, J.; IWAMASA, T.; ARASAKI, A.; HIRATSUKA, H.; SUNAKAWA, H.; KOHAMA, G.; ABO, T. Comparative study of oral squamous cell carcinoma in Okawa, Southern Japan and Sapporo in Hokkaido, northern Japan, with special reference to human papillomavirus and Epstein-Barr infection. *J Oral Pathol Med*, Copenhagen, v. 29, n. 2, p. 70-79, Feb., 2000.

VELAZCO, C.H.; COELHO, C.; SALAZAR,F.; CONTRERAS,A.; SLOTS,J.; PACHECO,J.J. Microbiological features of Papillon Le-Frève syndrome periodontitis. *J Clin Periodontol* , Copenhagen, v. 26, n. 9, p. 622-627,Sep.,1999.

VICTORIA, J. M.;GUIMARAES, A. L; DA 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 Res* v. 160, n. 1, p. 61-5, 2005.

WARA-ASWAPATI,N.; BOCH,J.A.; AURON,P.E. Activation of interleukin one beta gene transcription by Human cytomegalovirus: molecular mechanisms and relevance to periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*, Copenhagen, v. 18, n.2, p. 67-71, April, 2003.

WORKSHOP PARA CLASSIFICAÇÃO DE DOENÇAS PERIODONTAIS E CONDIÇÕES. *Annals of Periodontology*. v.4,n. 1 , Dec., 1999.

YADAV, M.; ARIVANANTHAN, M.; CHANDRASHENKAN, A.; TAN, B. S.; HASHIM, B. Y. Human herpesvirus-6 (HHV-6) DNA and virus encoded antigen in oral lesions. *J Oral Pathol Med*, Copenhagen, v. 26, n. 9, p. 393-401, Oct., 1997.

YAPAR, M.; SAYGUN, I.; OZDEMIR, A.; KUBAR, A.; SAHIN, S. Prevalence of human herpesviruses in patients with aggressive periodontitis. *J Periodontol*, Chicago, v. 74, n. 11, p. 1634-1640, Nov., 2003.

**APÊNDICE 1 - Termo de consentimento livre e informado**

Sou aluna de mestrado em Periodontia desta Faculdade e juntamente com meu meus orientadores -José Eustáquio da Costa e Ricardo Santiago Gomez- estou realizando um estudo sobre a influência do herpes na doença da gengiva. Para o estudo é necessário coletar material relacionado à inflamação/infecção da gengiva. A coleta deste material consiste somente em inserir uma ponta fina de papel entre o dente e a gengiva, isto é, na bolsa periodontal. Esse exame não dói, é gratuito e não oferece nenhum risco a saúde. Todas as informações colhidas terão finalidade exclusivamente científica e a não identificação do paciente na pesquisa será preservada. A participação no estudo pode ser cancelada e este consentimento cancelado por você em qualquer momento da pesquisa. Sendo que a não participação do estudo não altera o tratamento em curso na Clínica de Periodontia desta Faculdade.

Este documento tem como objetivo propor a sua participação neste estudo.

Eu, \_\_\_\_\_

autorizo a cirurgião-dentista Soraia Almeida Watanabe, CROMG 27996, a realizar a coleta do fluido da gengiva ou do menor sob minha responsabilidade, assim como a utilização de todos estes dados no estudo “A participação dos citomegalovírus na etiopatogênese da doença periodontal humana”. Afirmo que fui devidamente esclarecido quanto aos objetivos da pesquisa, quanto à preservação da minha imagem e da minha não identificação e quanto ao destino dos dados coletados. Ainda, que posso a qualquer momento da pesquisa retirar esse consentimento.

Belo Horizonte, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_.

---

Assinatura do paciente

COEP 3499-4592

Soraia Almeida Watanabe 9950 1145 - 3293 3009

## APÊNDICE 2

**A- Biologia molecular****Seqüência do DNA – HCMV**

Origem: Gene da glicoproteína B.

Acesso: X04606

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

1 ccgcggcgt ctcgggtgtc ttcagggagc gcaccgacc ttggtgcca agtccgtatc  
 61 cctctctc gactgcgggt gttcccga ggtccgcg gacacgaag agaccagac  
 121 ggcctcctc gctgctggat ttggcccgcg acga**acatgg aatccaggat ctggtgctg**  
 181 gtagtctgcg ttaacctgtg tategtctgt ctgggtgctg cggtttctc tttagtact  
 241 tccatgcaa ettctctac tcacaatgga agccatactt ctctagcagc gctgctcaa  
 301 acccgtcag tctattctca **acacgtaacg tcttctgaag cgc**tcagtca tagagccaac  
 361 gagactatc acaacactac cctcaagtac ggagatgtgg tgggagtcaa cactaccaag  
 421 taccctatc gcgtgtgttc tatggcccag ggtacggatc ttattcgett tgaacgtaat  
 481 atcatctgca cctcgatgaa gcctatcaat gaagactt**gg atgagggcat catggtgctc**  
 541 **ta**caagcgca acatcgtggc gcacacctt aaggtacggg tctacaaaa ggttttgacg  
 601 ttcgtcgta gctacgctta catctacacc acttatctgc tgggcagcaa tacggaatac  
 661 gtggcgctc ctatgtggga gattcatcac atcaacaagt ttgctcaatg ctacagtcc  
 721 tacagccgcg ttataggagg ca**cggttttc gtggcatatc ataggg**acag ttatgaaac  
 781 aaaaccatgc aattaattcc cgacgattat tccaacacc acagtaccg ttacgtgacg  
 841 gtcaaggatc agtggcacag ccgcggcagc acctggctct atcgtgagac ctgtaatctg  
 901 aactgtatgc tgaccatcac tactgcgcgc tccaagtatc cttatcattt tttgcaact

PCR específico para citomegalovírus - Iniciadores utilizados:

Et1- 5' ACA TGG AAT CCA GGA TCT GGT GCC 3'

F- (155-178) Tm: 61.8°C

EtA- 5' CCC TAT GAT ATG CCA CGA AAA CCG 3'

R- (766-743) Tm: 60.3°C

Produto de PCR 612 bp

Temperatura de anelamento: 58.4°C

It1- 5' CAA CAC GTA ACG TCT TCT GAA GCC 3'

F-(319-343) Tm: 60.8°C

ItA- 5' TAG ACC ACC ATG ATG CCC TCA TCC 3'

R-(542-519) Tm: 60.7°C

Produto de PCR 224 bp

Temperatura de anelamento: 57°C

A localização dos iniciadores no DNA está indicada com a seqüência destacada em vermelho.

**B - Soluções utilizadas na extração do DNA**

Somente reagentes com alto grau de pureza serão utilizados no preparo das soluções (SIGMA, Pharmacia, Promega, Stratagene, etc.)

**a) Solução de Krebs**

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

**b) Extração do DNA**

Sílica: SiO <sub>2</sub>	60 g
H <sub>2</sub> O qsp	500 ml

Preparo da sílica (SC)

- Ressuspender em cilindro graduado  $\phi=5$  cm; alt. 27,5 cm (col. H<sub>2</sub>O)
- Sedimentar por 24 hs; TA
- Descartar o sobrenadante e adicionar H<sub>2</sub>O qsp 500 ml. Ressuspender o sedimento.
- Deixar a TA por 5 hs. E descartar o sobrenadante.
- Adicionar a suspensão 600  $\mu$ l para ajustar o pH para 2.0.
- Aliquotar e autoclavar. A suspensão é estável por no mínimo 6 meses.

**c) 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

**d) 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.

**e) 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.

**f) Acetona 100%**

Utilizar acetona de qualidade compatível com processos de Biologia Molecular

**g) Tampão TE**

- 1º) Preparar as seguintes soluções :
  - Tris-HCl 1 M pH 8.0

- EDTA 0,5 M pH 8.0
- 2°) 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
- 3°) Completar o volume final com água milli-Q;
- 4°) Homogeneizar;
- 5°) Autoclavar;
- 6°) Conservar a temperatura ambiente.

### C- Soluções utilizadas na eletroforese em gel de agarose

#### a) EDTA 0,5 M

EDTA            18,61g  
 H<sub>2</sub>O qsp        1000ml  
 Acertar pH para 7,5 com NaOH

#### b) Tampão Tris-acetato (TAE) 50X

Tris base                    242,0g  
 Ácido acético glacial        57,1ml  
 EDTA 0,5M Ph 8,0            100ml  
 H<sub>2</sub>O qsp                        1000ml

#### c) TAE 1x

TAE 50X                    40ml  
 H<sub>2</sub>O qsp                        2000ml

#### d) Gel de agarose 1,5%

Agarose                    1,5g  
 TAE 1X qsp                100ml

#### e) Tampão de amostra 6x

**Azul de bromofenol            0,025g**  
 Glicerol                        3ml  
 H<sub>2</sub>O MILLI Q qsp                10ml

#### f) Brometo de Etídio 0,3µg/ml

Brometo de Etídio 10 mg/ml        6,0µl  
 H<sub>2</sub>O qsp                        200ml

**D- Soluções utilizadas na eletroforese em gel de poliacrilamida 6,5%****a) Acrilamida 30%**

Para cada 100mL de solução:

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

**b) TBE 20X**

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

**c) TBE 10X**

- |                           |        |
|---------------------------|--------|
| - TBE 20X                 | 500ml  |
| - H <sub>2</sub> O q.s.p. | 1000ml |

**d) TBE 1X**

- |                           |        |
|---------------------------|--------|
| - TBE 50X                 | 50ml   |
| - H <sub>2</sub> O q.s.p. | 1000ml |

**e) Confecção do gel de poliacrilamida**

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

○ Acrilamida 30%	1,079ml
○ TBE 10X	0,65ml
○ Água destilada	3,22ml
○ TEMED	4,00 $\mu$ l
○ APS	40,00 $\mu$ l

### **E - Soluções utilizadas na coloração do gel de poliacrilamida pela prata**

#### **a) Solução de Prata**

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

#### **b) Solução Reveladora**

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

#### **c) Ácido Acético 10%**

Para cada 5l de solução

Ácido acético glacial	500ml
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p.	5l