



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**PESQUISA DE VÍRUS EM BOLSAS PERIODONTAIS DE
DOENTES COM PERIODONTITE CRÓNICA**

Trabalho submetido por
Marta Costa Picolo
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Dezembro de 2019



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**PESQUISA DE VÍRUS EM BOLSAS PERIODONTAIS DE
DOENTES COM PERIODONTITE CRÓNICA**

Trabalho submetido por
Marta Costa Picolo
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutor Francisco João Salvado Silva

e coorientado por
Prof. Doutora Helena Barroso

Dezembro de 2019

AGRADECIMENTOS

Perante esta página, que relembra sempre a despedida, queria em primeiro lugar agradecer ao meu orientador Professor Doutor Francisco Salvado que em tudo se disponibilizou e me ajudou a desenvolver este trabalho, a si, obrigada por todo o apoio, disponibilidade e preocupação constantes. Agradeço também de forma igualmente especial à minha coorientadora Professora Doutora Helena Barroso, por toda a disponibilidade e ajuda em todas as etapas. Uma grande obrigada, aos dois.

Um agradecimento também especial à minha encarregada de educação, Lia Costa, que custeou este trabalho e permitiu a sua realização.

A todos os professores que pelo meu caminho se atravessaram e à Direção Clínica, um sincero obrigada por todo o conhecimento e oportunidades disponibilizadas.

À minha Mãe, Avós, Irmã, Irmão e Primo e a todas as 221 estrelinhas que tenho a olhar por mim um sincero agradecimento por sempre me apoiarem nos meus sonhos e remarem comigo contra todas as marés difíceis. Sem vocês nada disto seria possível.

À minha colega de box, Inês Calau, a minha irmã para sempre. Sem ti nada disto seria alguma vez possível, sem ti tudo seria diferente e sem graça; trouxeste vida a todos os dias que passei contigo, levo-te contigo no coração sempre e para sempre.

Como a família não é só de sangue, à família que eu escolhi e me acompanha desde o 1º dia, um agradecimento especial aos ULTRAS e ao João Rato, que são pilares e sorrisos diários.

AEIUEM que deste o 1º ano foste casa para muitas amizades, muita aprendizagem e realização pessoal. Uma associação que me trouxe valores e características e me ajudou, sem dúvida a enriquecer enquanto pessoa.

À minha amiga Natacha Inácio do Laboratório de microbiologia que tornou o meu verão menos solitário. Obrigada por partilhares comigo o teu conhecimento.

Hoje, que é o primeiro dia do resto da minha vida, um enorme “OBRIGADA” a ti EGAS MONIZ, que me recebeste de braços abertos, despeço-me de ti já com saudade de tudo o que me proporcionaste. “*À academia!*”

RESUMO

Introdução: A Periodontite é uma patologia inflamatória dos tecidos de suporte dentários. A sua etiologia é multifatorial, sendo a causa bacteriana apontada como primordial para o seu desenvolvimento. Recentemente, estudos demonstram que os vírus podem atuar como patógenos putativos desta doença. O objetivo da presente investigação prende-se com a avaliação da associação entre quatro vírus: Herpes Simples 1 e 2 (HSV1 e HSV2), Epstein-Barr (EBV) e Citomegalovírus (CMV) e a patologia periodontal.

Materiais e Métodos: Um total de 100 pacientes, da Clínica Universitária Egas Moniz, foram incluídos no estudo, após assinatura de um consentimento informado. Dos 100 indivíduos, 50 apresentavam doença periodontal e 50 periodonto saudável. Amostras de fluído crevicular foram extraídas com auxílio de cones de papel previamente esterilizados e analisadas à posteriori. Procedeu-se primeiramente à extração de DNA e seguidamente ao teste PCR *Multiplex (Polymerase Chain Reaction)* para avaliar a presença dos vírus enunciados.

Resultados: Foram detetados, em pacientes periodontalmente comprometidos, HSV1, HSV2, EBV e CMV (38%, 24%, 32% e 12% respetivamente, dos indivíduos possuíam estes vírus no fluído crevicular). No grupo saudável foram detetados HSV1, HSV2 e EBV em 2% dos indivíduos e em nenhum foi detetado CMV.

Conclusão: Face aos resultados obtidos parece haver uma associação entre a presença de HSV1, HSV2, EBV e doença periodontal. Os vírus não são a etiologia primordial da Periodontite, no entanto, podem exercer um papel na mesma, contribuindo para a sua severidade e reativação, consequentemente o planeamento de uma terapêutica contra estes vírus pode auxiliar no tratamento periodontal.

Keywords: Vírus; Herpes Simples 1; Herpes Simples 2; Epstein-Barr; Citomegalovírus; Doença Periodontal; PCR Multiplex

ABSTRACT

Introduction: Periodontitis is an inflammatory pathology of the tooth supporting tissues. Its etiology is multifactorial, however, the bacterial cause is considered as primordial for its development. Recently, studies have shown that viruses can act as putative pathogens of this disease. The goal of the present investigation is related to the evaluation of the association between four viruses: Herpes simplex 1 and 2 (HSV1 and HSV2), Epstein-Barr (EBV) and Cytomegalovirus (CMV) and periodontal pathology.

Materials and methods: A total of 100 patients, from Clínica Universitária Egas Moniz, were enrolled in the study, by signing an informed consent. Of the 100 individuals, 50 had periodontal disease and 50 healthy periodontium. Samples of crevicular fluid were extracted with the aid of paper cones previously sterilized and analyzed retrospectively. DNA extraction was performed first and then the PCR *Multiplex* test (*Polymerase Chain Reaction*) to evaluate the presence of the viruses.

Results: In patients, periodontally compromised, HSV1, HSV2, EBV and CMV (38%, 24%, 32% and 12% respectively, of the individuals had these viruses in the crevicular fluid). In the healthy group, HSV1, HSV2 and EBV were found in 2% of the individuals and in no cmv was found.

Conclusion: In view of the results obtained there seems to be an association between the presence of HSV1, HSV2, EBV and periodontal disease. Viruses are not the primary etiology of Periodontitis, however, they can play a role in it, contributing to their severity and reactivation, consequently the planning of a therapy against these viruses can aid in periodontal treatment.

Keywords: Virus Herpes simplex 1; Simple Herpes 2; Epstein-Barr; Cytomegalovirus Periodontal disease; Multiplex PCR

INDÍCE

I.	Introdução	15
1.	O Periodonto.....	15
a.	A Gengiva	15
b.	O Ligamento Periodontal	17
c.	O Cimento Radicular.....	17
d.	O Osso Alveolar	18
e.	Metabolismo Ósseo.....	19
2.	O Flúido Crevicular.....	21
3.	A Doença Periodontal e sua Classificação.....	24
3.1.	Fatores de Risco para a Doença Periodontal	30
a.	Hábitos Tabágicos	31
b.	Stress ou depressão	31
c.	Distúrbios Hematológicos.....	32
d.	Diabetes não controlada.....	32
3.2.	Tratamento da Doença Periodontal	33
4.	Os Vírus	35
4.1.	A Infecção Viral	35
4.2	Resposta Imune do Hospedeiro	37
4.3	Vírus Herpes Simples 1 e 2	38
4.4	Vírus Epstein-Barr.....	39
4.5	Citomegalovírus.....	40
4.6	Influência dos Vírus da família <i>Herpesviridae</i> na resposta imune do hospedeiro ...	41
5.	PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i> ou Reação de polimerização em cadeia)	43
6.	PCR para avaliação da presença de determinado microrganismo	45
7.	Vírus e Doença Periodontal	47
8.	Objetivos do Estudo	49
II.	Materiais e Métodos	51
III.	Resultados	59
III.1	Caraterização da amostra.....	59
III.2	Pesquisa de Vírus	63

III.2.1	Presença de vírus HSV-1	65
III.2.2	Presença de vírus HSV-2.....	66
III.2.3	Presença de vírus EBV	67
III.2.4	Presença de vírus CMV	68
III.3	Avaliação da associação entre a presença de vírus e as variáveis utilizadas para caracterizar a amostra	69
a.	Relação com a idade	69
b.	Relação com o sexo do participante	69
c.	Relação com hábitos alcoólicos	70
d.	Relação com hábitos tabágicos, higiene oral e Diabetes	70
IV.	Discussão de resultados	71
V.	Conclusão	79
VI.	Referências Bibliografia	81
VII.	Anexos	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representação dos constituintes do periodonto: gengiva (G), ligamento periodontal (PL), cemento radicular (RC) e osso alveolar próprio (ABP). (Adaptado de Lindhe & Lang, 2010).

Figura 2: Modelo Proposto por Contreras & Slots em 2000 para o desenvolvimento da Periodontite mediada por vírus. Este demonstra a influência que os mesmos podem exercer sobre o equilíbrio do sistema.

Figura 3: A e B: centrífugadora utilizada e C: vortéx utilizado para preparação das amostras perante o procedimento de extração de DNA.

Figura 4: Eppendorfes utilizados na experiência em base de gelo, respetivamente rotulados para posterior identificação. Na figura temos um dos testes brancos (B) e a preparação correspondente ao DNA extraído da amostra número 25 (25).

Figura 5: Gel de Agarose após solidificação com um pente de 22 poços.

Figura 6: Disposição das amostras no gel de Agarose. Na figura observamos a colocação do Marcador V (V), do Marcador VI (VI) e do branco (B) isoladamente, as 10 amostras com ADN juntas sem poços de intervalo.

Figura 7: Gel de Agarose observado à luz UV onde se denotam bandas correspondentes à presença de DNA viral.

Figura 8: Resultados dos testes de PCR relativos à pesquisa de vírus HSV-1 (vermelho), HSV-2 (azul), EBV (amarelo) e CMV (verde) para as amostras (21-40) correspondentes a doentes periodontais. As marcações presentes procuram demonstrar como foram identificados os vírus. O marcador indicado é o V (mV) onde se destacam das bandas de 200pb, 300 pb e 400 pb. Imediatamente após este temos um poço com o teste branco (B).

Figura 9: Resultados de PCR para 10 indivíduos do grupo com periodonto saudável (81-90). Estão representados 2 marcadores o V (mV) e o VI (mVI).

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Estádios da classificação da patologia periodontal.

Tabela 2: Nova classificação do estágio da periodontite e seus condicionantes (Adaptado de Panos Papapanou et al. e Tonetti et al. em 2018).

Tabela 3: Nova classificação do grau da periodontite e seus condicionantes (Adaptado de Panos Papapanou et al. e Tonetti et al. em 2018).

Tabela 4: Vantagens e desvantagens de 3 tipos de técnicas de PCR (Adaptado de Ambili, et al. 2013)

Tabela 5: Primers, forward e reverse, para amplificação de cada vírus pesquisado (adaptado de Kazi, M., Bharadwaj, R., Bhat, K. & Happy, D. 2015)

Tabela 6: Vírus e as suas respetivas pares de base.

Tabela 7: Valores de p ($>0,05$) obtidos pelo teste Qui-Quadrado ao averiguar a associação entre as variáveis "vírus" e "idade do doente periodontal".

Tabela 8: Valores de p ($>0,05$) obtidos pelo teste Qui-Quadrado ao averiguar a associação entre as variáveis "vírus" e "sexo do doente periodontal".

Tabela 9: Valores de p ($>0,05$) obtidos pelo teste Qui-Quadrado ao averiguar a associação entre as variáveis "vírus" e "hábitos alcoólicos do doente periodontal".

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 e 2: Distribuição dos participantes do estudo por género no grupo saudável (n=50) e doente periodontal (n=50).

Gráfico 3 e 4: Distribuição dos participantes do estudo por indivíduos fumadores no grupo saudável (n=50) e doente periodontal (n=50).

Gráfico 5 e 6: Distribuição dos participantes do estudo pelos hábitos tabágicos no grupo saudável (n=50) e doente periodontal (n=50).

Gráfico 7 e 8: Distribuição dos participantes do estudo por hábitos de higiene oral no grupo saudável (n=50) e doente periodontal (n=50).

Gráfico 9: Proporções virais de HSV-1 encontradas no grupo saudável e no grupo de doentes periodontais. A verde escuro representa-se o número de amostras que contêm HSV-1 e a verde claro as amostras onde este não estava presente, para cada grupo de estudo (n=50 para ambos os grupos).

Gráfico 10: Proporções virais de HSV-2 encontradas no grupo saudável e no grupo de doentes periodontais. A verde escuro representa-se o número de amostras que contêm HSV-2 e a verde claro as amostras onde este não estava presente, para cada grupo de estudo (n=50 para ambos os grupos).

Gráfico 11: Proporções virais de EBV encontradas no grupo saudável e no grupo de doentes periodontais. A verde escuro representa-se o número de amostras que contêm EBV e a verde claro as amostras onde este não estava presente, para cada grupo de estudo (n=50 para ambos os grupos).

Gráfico 12: Proporções virais de CMV encontradas no grupo saudável e no grupo de doentes periodontais. A verde escuro representa-se o número de amostras que contêm CMV e a verde claro as amostras onde este não estava presente, para cada grupo de estudo (n=50 para ambos os grupos).

LISTA DE ABREVIATURA

CMV – Citomegalovírus

EBV – Epstein-Barr

HSV1 – Herpes Simples 1

HSV2 – Herpes Simples 2

IgA – Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G

IL- α – Interleucina α

IL- β – Interleucina β

MMPs – Metaloproteínases da Matriz

PCR – *Polymerase Chain Reaction* ou teste de polimerização em cadeia

Pb – Pares de Base

I. Introdução

1. O Periodonto

Periodonto, também chamado de *aparelho de inserção das peças dentárias*, deriva das palavras *Peri* (em redor) e *Odonto* (dente) e é constituído por quatro estruturas específicas, sendo elas a gengiva, o osso alveolar, o cimento radicular e o ligamento periodontal (Figura 1.) (Lindhe, 2010).

É composto por tecidos moles e duros, representando uma estrutura complexa e dinâmica que providencia suporte às peças dentárias (Garlet et al., 2012), assegurando a conexão do dente ao osso de ambos os maxilares mantendo a sua integridade, no entanto é esperado que esta unidade biológica sofra alterações ao longo da vida de todos os indivíduos de forma natural, ou mesmo por modificações no meio oral (Lindhe, 2010).

a. A Gengiva

Um dos constituintes do Periodonto é a gengiva, uma membrana mucosa, cuja forma e textura são influenciadas pela erupção final dos dentes e que se continua com o palato e com a pele dos lábios. Esta faz parte da mucosa mastigatória que envolve o osso alveolar e circunda as peças dentárias na sua região cervical (Lindhe, 2010).

Na porção coronal, assume forma festonada e uma cor rosa clara, delimitando a *Gengiva Marginal Livre*, no entanto, na sua porção apical segue o contorno do osso alveolar, tendo essencialmente uma função de revestimento – *Gengiva Inserida*. Estes dois tipos de gengiva encontram-se separados por uma linha visível macroscopicamente denominada de *Linha Mucogengival (LMG)*.

Apesar de este constituinte do periodonto ter de modo geral coloração rosa clara de, pode apresentar outras colorações dependendo da fisiologia ou raça do indivíduo (Paridah et al., 2016).

A Gengiva livre estende-se apicalmente até à *Junção Amelocementária (JAC)*, onde se encontra o epitélio juncional. Encontra-se tanto a vestibular como a palatino dos dentes, sendo também representada pelas papilas interdentárias.

A Gengiva Livre forma uma pequena invaginação na interface dente-gengiva, estando em contacto íntimo com o esmalte dentário e estende-se entre 1,5 a 2 mm no sentido coronal a partir da JAC (Lindhe, 2010).

Uma das principais características da gengiva é o seu sulco, que mede entre 1 a 2 milímetros de profundidade e representa um foco para a colonização de microrganismos que conseqüentemente ativam uma resposta inflamatória (Creanor, 2016).

A Gengiva Inserida faz-se representar pela LMG, entre o epitélio juncional – ou JAC caso este não exista – e a mesma, continuando depois apicalmente com a mucosa oral de revestimento. A Gengiva inserida encontra-se marcadamente aderida, através de fibras de tecido conjuntivo, ao osso alveolar e cemento radicular adjacentes, mostrando-se imóvel, quando comparada com a mucosa oral circundante. A mucosa alveolar ou de revestimento, que reveste o osso, é constituída por fibras de tecido conjuntivo mais laxas, o que resulta numa maior mobilidade da mucosa quando comparada à Gengiva Inserida. (Lindhe, 2010).

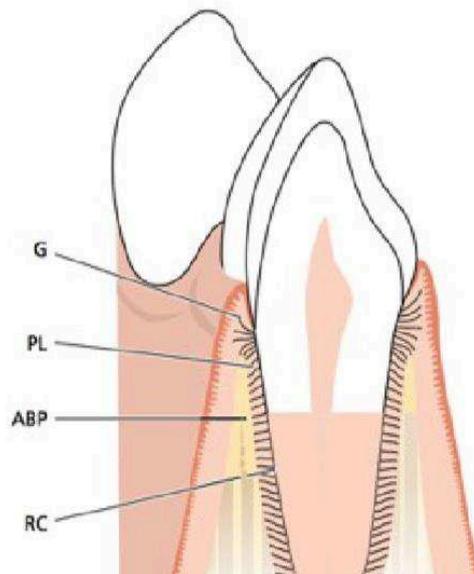


Figura 1: Representação dos constituintes do periodonto: gengiva (G), ligamento periodontal (PL), cemento radicular (RC) e osso alveolar próprio (ABP). (Adaptado de Lindhe & Lang, 2010).

b. O Ligamento Periodontal

O Ligamento Periodontal (LP) envolve a porção radicular do dente e é constituído por tecido conjuntivo laxo, sendo muito vascularizado. A sua função é a ancoragem das peças dentárias, através do cimento, ligando-o ao osso alveolar (Isaka, Ohazama, Kobayashi, et al., 2001), no entanto auxilia também no processo de mastigação, uma vez que todas as forças geradas, aquando desta necessidade básica ou outras que envolvam contacto dentário, sejam distribuídas uniformemente e transmitidas ao osso alveolar. A sua largura é em média de 0,25 mm e esta característica afeta, em conjunto com a sua altura e aspetos qualitativos, a mobilidade dentária (Lindhe, 2010).

O LP é composto por uma série de células com capacidade odontoblástica e fibroblástica (McCulloch & Melcher, 1983), e o tecido conjuntivo que o constitui é formado por fibras de colagénio que se inserem em grupos diferentes conforme a sua orientação. As fibras do LP propriamente dito aparecem a par da erupção dentária e vão alterando a sua direção à medida que o dente ganha espaço na arcada para atingir a sua posição de oclusão, sofrendo remodelações altamente regulares (Lindhe, 2010).

c. O Cimento Radicular

O Cimento Radicular (CR) corresponde ao tecido mineralizado e não vascularizado, com cerca de 65% de hidroxiapatite envoltos numa matriz de colagénio, que reveste as raízes das peças dentárias (Bosshardt & Selvig, 1997) e, por vezes porções coronais dos mesmos. Este constituinte do Periodonto tem função de ancoragem do LP à superfície dentária e reparação de danos regionais. O CR apresenta uma formação constante ao longo da vida do indivíduo (Lindhe, 2010).

Na sua constituição orgânica apresenta, na sua maioria, fibras de colagénio I (Nanci & Bosshardt, 2006). O CR é gerado a partir de cementoblastos ou células do ligamento periodontal que se encontram à sua superfície. À semelhança do osso, também existem células mais especializadas do tecido, em lacunas, denominados de cementócitos. Estas células diferenciadas contactam umas com as outras através de processos citoplasmáticos, que permitem difusão de substâncias essenciais ao tecido, como nutrientes, e a eliminação de substâncias tóxicas, mantendo assim a sua vitalidade (Lindhe, 2010).

d. Osso Alveolar

O Osso Alveolar consiste no tecido mineralizado, com 60% de hidroxiapatite, que permite a inserção dentária e onde reside o foco de absorção de forças, provenientes da mastigação ou outras funções e a sua transmissão ao processo alveolar (Lindhe, 2010). É um órgão ativo metabolicamente e composto por uma matriz mineral e orgânica (Schwartz, Goultschin, Dean & Boyan, 1997).

O processo alveolar corresponde ao osso da mandíbula e maxila propriamente dito, onde estão inseridos os alvéolos dentários, mas também onde se inserem células que nada têm a ver com o desenvolvimento dos próprios dentes (Lindhe, 2010).

Anatomicamente a tábua óssea vestibular do processo alveolar mandibular é mais espessa que na porção lingual e a nível maxilar as tábuas ósseas são mais espessas na região molar e, mais delgadas anteriormente. Os alvéolos dentários estão revestidos por osso compacto e entre eles existe osso esponjoso. O osso esponjoso é formado por trabéculas ósseas cuja dimensão depende das forças a que o osso está sujeito ou mesmo de fatores genéticos (Lindhe, 2010).

A homeostasia do osso e a sua manutenção responde a fatores nutricionais, hormonais e mecânicos que resultam na constante renovação óssea. Os osteoblastos são responsáveis por mecanismos de formação óssea, tendo uma atividade contrária aos osteoclastos, células de grandes dimensões que degradam tecido mineralizado (osso, cimento ou dentina), que atuam na sua reabsorção. Estes processos são controlados por influência hormonal e fatores locais que trabalham para regular os níveis de cálcio a nível do plasma e do osso (Hienz, Paliwal, & Ivanovski, 2015).

Os Osteoblastos ao formarem matriz podem ficar ainda circundados por esta diferenciando-se em osteócitos que com longos prolongamentos citoplasmáticos permitem a comunicação a nutrição do osso

Podemos por isso dizer que, o osso alveolar se renova conforme as exigências funcionais (Lindhe, 2010).

No esqueleto humano existem dois tipos morfológicos de osso, cada um com a sua função. O que ocupa a maior parte dos ossos (80%) é o osso cortical, que é denso, contendo entre 80-90% de conteúdo mineral e marcado por baixo nível de atividade óssea.

Este primeiro tipo é típico de ossos longos e reveste todos os ossos do organismo, sendo fundamental para funções mecânicas, de proteção e estrutura.

Outro tipo de osso existente é o osso trabeculado, correspondendo a cerca de 20% das peças ósseas do corpo humano. Ao contrário do osso cortical este apresenta uma alta atividade metabólica, possuindo menos conteúdo mineral (5%-20%) e por isso menos denso (Lindhe, 2010).

e. Metabolismo Ósseo

O turnover ósseo é um processo contínuo caracterizado por uma contante reabsorção e remineralização. Este mecanismo do osso é justificado pela necessidade de preservação da integridade mecânica do esqueleto e a regulação dos níveis de cálcio e fósforo com vista a manter a homeostasia (Chapurlat & Confavreux, 2016).

Como referido anteriormente os osteoblastos e osteoclastos representam a máquina biológica que permite o metabolismo ósseo. Os primeiros permitem a formação de uma matriz mineralizada em fibras colagénicas, enquanto os segundos a reabsorvem. Os osteoclastos são ativados no início da reabsorção, estando a sua membrana fenestrada voltada para a matriz óssea para a secreção de prótons e enzimas que se mostram essenciais à função deste tipo de célula, sendo que o seu polo que se encontra relacionado com o meio exterior possui recetores para hormonas e outras substâncias (Christenson, 1997).

Os Osteoclastos ancoram as suas fenestrações à matriz óssea mineralizada, nesta zona o pH encontra-se diminuído e denota-se a presença de enzimas potentes como é o caso de fosfatases ácidas, metaloproteínases, entre outras. Em conjunto estes fatores resultam na desmineralização das matrizes colagénicas originando uma lacuna. Os Osteoblastos, responsáveis pela remineralização, posteriormente à formação de uma lacuna por ação osteoclástica empenham-se na formação de matriz mineralizada nestas zonas com o auxílio de proteínas de matriz óssea que eles próprios sintetizam e secretam. Ao acontecer este fenómeno alguns osteoblastos ficam retidos na matriz diferenciando-se em osteócitos (Christenson, 1997).

2. O Fluido Crevicular

O Fluido Crevicular é um fluido que banha o sulco gengival e que tem origem no filtrado sanguíneo dos respectivos vasos que vascularizam esta zona da gengiva (Taylor, & Preshaw, 2015), tendo a sua presença sido evidenciada desde o século XIX (Barros, Williams, Offenbasher & Morelli, 2016).

A Artéria Dentária, superior e inferior, é a principal responsável por suprir os alvéolos dentários sendo ramo da Artéria Dentária Alveolar.

A Artéria Dentária subdivide-se, imediatamente antes de penetrar nos canais dentários, dando origem a ramos que irão suprir a porção apical do ligamento periodontal. Estes ramos dão origem às Artérias Intra-septais, que originam os ramos Terminais Perfurantes. Os ramos Terminais Perfurantes penetram no osso alveolar suprindo todo o alvéolo dentário (Lindhe, 2010).

O tecido conectivo periodontal é altamente vascularizado, o que permite a passagem de células, enzimas e outras moléculas do sangue para os tecidos circundantes. Este filtrado sérico que ocupa a região do sulco gengival é denominado de Fluido Crevicular (Taylor & Preshaw, 2015).

Tanto os tecidos gengivais como o Fluido Crevicular contém um teor complexo de componentes imunitários que não só se dispõem no sulco gengival como também são libertados na cavidade oral (Ebersole et al., 2013). O Fluido Crevicular contém elementos fundamentais, como leucócitos, anticorpos, sistemas complemento, entre inúmeros outros componentes sanguíneos que procuram assegurar a resposta imune do tecido em questão, caso ocorra invasão de placa bacteriana na região subgengival. Assim sendo, é visto como uma base de pesquisa de diferentes marcadores inflamatórios, em episódios de inflamação periodontal, que podem levar a entender a relação hospedeiro-patogénicos de forma rigorosa (Taylor & Preshaw, 2015).

Este Fluido, contém ainda componentes do sistema imune adaptativo, cujo principal objetivo é contribuir para a homeostasia quando exista uma interação entre os micro-organismos presentes, como bactérias e o indivíduo (Ebersole et al. 2013) A sua análise tanto em indivíduos com periodonto saudável como em indivíduos doentes demonstrou a secreção de citocinas por parte de células presentes, sendo que a interleucina alfa (IL-1 α) e a IL-1 β aumentam a adesão de células polimorfonucleadas,

monócitos e macrófagos ao endotélio, o que estimula a produção de prostaglandinas E2, libertação de enzimas lisossomais e reabsorção óssea (Gupta, 2013). Em contrabalanço existe também o interferão- α que inibe a atividade de IL-1 β e inibe a reabsorção óssea como mecanismo de proteção, gerando um equilíbrio (Lamster & Novak, 1992).

O Fluido Crevicular é produzido em maior quantidade no doente periodontal, sendo muitas vezes proporcional à severidade da inflamação presente (Shapiro et al., 1979). Todavia, o seu volume aumenta aquando da mastigação de certos alimentos, massagem gengival, hormonas ou mesmo pelo tabaco (McLaughlin et al. 1993).

Perante o quadro de Periodontite o pH no sulco gengival eleva-se para cerca de 8,5, sendo resultado da degradação proteica por parte das bactérias presentes que utilizam proteínas como nutriente principal, culminando na produção de amónia como subproduto. A amónia ao influenciar o aumento de pH permite ainda a precipitação de sais de cálcio presentes no fluido crevicular, levando à formação de cálculo subgengival (Barros, Williams, Offenbacher & Morelli, 2016).

3. A Doença Periodontal e sua classificação

O estado de Saúde Periodontal é definido pela ausência de inflamação detetada clinicamente. É por isso compatível com homeostasia regulada onde a predominância de infiltrado neutrofilico é consistente com uma gengiva clinicamente saudável (Lang & Bartold, 2018). É um estado livre de doença inflamatória periodontal que assegura ao indivíduo uma função normal e evita as consequências que se fariam sentir por doença corrente ou passada (Chapple et al., 2018).

A Periodontite é uma patologia inflamatória e infecciosa crónica que condiciona negativamente as estruturas de suporte dentárias – gengiva, cemento, ligamento periodontal e osso alveolar – culminando numa posterior perda de inserção. As estruturas que suportam as peças dentárias formam o Periodonto, sendo elas a gengiva, o osso alveolar, o cemento e o ligamento periodontal (Hajishengallis, 2015). A Doença Periodontal pode ser geralmente controlada com sucesso e as peças dentárias podem mesmo ser mantidas para a vida com uma sequência de tratamentos consecutivos e um follow-up rigoroso do doente, dando-se sempre uma extrema importância ao diagnóstico que deve ser cuidado e com auxílio a meios de diagnóstico para se tornar mais preciso (Chapple et al., 2018).

Como causa primária da Doença Periodontal contamos com bactérias anaeróbias que fazem parte do biofilme oral e cuja acumulação por higiene oral descuidada é bastante frequente, (Armitage, 1999) sendo que a doença pode apresentar fases de exacerbação ou mesmo períodos mais estáveis após controlo e tratamento por parte de um Médico Dentista. As fases estáveis, podem no entanto, dar lugar novamente a fases de doença ativa, pelo que estes pacientes são considerados de risco, sendo o follow-up importantíssimo (Chapple et al., 2018).

A Doença Periodontal era anteriormente classificada em Crónica ou Agressiva. As alterações gengivais que pressupõem doença eram divididas em dois tipos: as que são induzidas por placa bacteriana e as que não estão associadas a este fator, uma vez que causas sistémicas podem estar associadas a uma expressão clínica modificada da gengiva. Estes fatores que alteram a aparência clínica da gengiva (ex: fármacos, alterações do sistema endócrino ou mesmo desregulação nutricional) (Armitage, 2000).

Recentemente as classificações anteriores de Periodontite Agressiva ou Crônica (generalizada ou localizada), necrotizante ou periodontite como manifestação de doença sistêmica foram alteradas. Atualmente classificamos a Doença Periodontal recorrendo a Estádios e Graus, continuando a classificar como Periodonto Saudável e Gengiva Saudável, se assim se confirmar. As duas nomenclaturas anteriores inserem-se, neste momento, no grupo “periodontite” que se explicará mais à frente neste capítulo (Caton et al., 2018).

Um indivíduo considerado saudável em termos periodontais e gengivais é todo o indivíduo que apresente uma gengiva aparentemente normal com ausência de sangramento num periodonto reduzido ou intacto. Neste grupo estão inseridos pacientes com saúde periodontal ou mesmo doentes periodontais que se encontrem estáveis (Lang & Bartold, 2018).

Por outro lado, uma gengiva sangrante ao processo de sondagem deve ser tida em conta para um diagnóstico de gengivite. O termo gengivite refere-se a uma condição inflamatória da gengiva causada pela acumulação de biofilme, marcada por uma gengiva avermelhada, com sangramentos espontâneos e edematosa, mas com ausência de perda de suporte periodontal, cursando geralmente sem dor (Trombelli, Farina, Silva & Tatakis, 2018).

Dentro da gengivite são apresentados dois tipos, a induzida por biofilme oral e a não induzida por biofilme (Caton et al., 2018). Dentro do campo da Gengivite induzida por placa bacteriana temos três tipos: a que está associada apenas com a presença de biofilme; a que está associada à terapia com certos fármacos que induzem a sua hiperplasia; e mesmo a fatores de risco locais ou sistêmicos (Murakami, Mealey, Mariotti, & Chapple, 2018).

A gengiva induzida por placa é reversível se o fator etiológico for eliminado, mas pode tornar-se crônica na sua persistência (Tonetti et al., 2015).

Quanto à gengivite não induzida por biofilme são vários os fatores que podem estar na sua origem, como fatores genéticos, infecções específicas, doenças endócrinas, deficiências nutricionais, lesões traumáticas, pigmentação, entre outras (Holmstrup & Plemons, 2018).

Um paciente que se apresente com gengivite representa uma inflamação tida como reversível, a inflamação gengival pode reverter-se para um estado de saúde gengival

novamente. O mesmo não acontece com um doente periodontal, que embora tratamentos contínuos e follow-ups atentos continua a ser um doente periodontal para o resto da sua vida, necessitando de tratamentos de suporte e vigilância para evitar possíveis recorrências (Chapple et al., 2018; Jepsen et al., 2018).

Segundo a nova classificação existem três grupos de diagnóstico periodontal, estes são: Doença Periodontal Necrotizante (onde se inserem também gengivites necrotizantes e estomatites necrotizantes); Periodontite (agora classificada de acordo com estádios e graus); e Periodontite como manifestação de doenças sistémicas (onde podemos destacar *Diabetes mellitus*, hábitos tabágicos, osteoporose, entre variadíssimas outras) (Caton et al., 2018).

A Doença Periodontal pressupõe que exista inflamação gengival em regiões onde ocorreu migração apical do epitélio juncional e destruição de osso alveolar com perda de tecido conjuntivo (Armitage, 2004). A perda de tecido duro e molde circundante às peças dentárias afetada é irreversível e pode mesmo resultar na perda dos dentes em causa (Tonetti et al., 2015).

Clinicamente a Periodontite é marcada por edema, eritema, hemorragia à sondagem, profundidade de sondagem aumentada que pressupõe perda de inserção, bolsas periodontais (Armitage, 2004), mobilidade dentária e perda de osso alveolar comprovada por diagnóstico radiográfico (Offenbacher et al., 2008; Imai et al., 2012).

Para o diagnóstico da Periodontite utilizamos agora a classificação em Estádios e Graus. Os estádios prendem-se com a severidade da doença (Tabela 1. e 2.) e são representados em numeração romana em I, II, III e IV por ordem crescente de severidade e complexidade de abordagem. Para a classificação do estágio e do grau são importantes registos radiográficos (status radiográfico).

A ausência de dentes e a investigação de como esses dentes foram perdidos – se tinham história de mobilidade ou se se tratou de uma cárie severa que destruiu a coroa – torna-se relevante, assim como o número de peças dentárias remanescentes. Para agravamento do grau temos ainda os níveis de profundidade de sondagem, as mobilidades dentárias, defeitos de furca e defeitos ósseos (Caton et al., 2018).

Ao estágio adicionamos ainda a extensão e distribuição da doença, ou seja, se é localizada (<30%) ou generalizada onde >30% das localizações existentes se encontram afetadas.

Já relativamente ao Grau, que avalia o risco de progressão e antecipa a resposta ao tratamento, este varia entre três possíveis: A; B; e C, também em ordem crescente de risco de progressão da doença (Tabela 3.). Para a definição do grau torna-se importante como referido anteriormente que se apoie o diagnóstico em meios complementares de diagnóstico como o status radiográfico que neste caso nos pode ser altamente útil uma vez que ao pesquisar a região com maior reabsorção óssea é-nos possível chegar à percentagem de destruição óssea através de um rácio entre o comprimento de osso perdido em milímetros e a idade do doente. Este fator juntamente com outros fatores de risco, como hábitos tabágicos regulares e quotidianos e hiperglicemia permitem a classificação do grau, sendo que o número de cigarros por dia ou uma glicemia acima de valores padrão se tornam em agravadores de grau (Caton et al., 2018).

Tabela 1: Estádios da classificação da patologia periodontal.

Estádios	
I	Periodontite em estado inicial
II	Periodontite Moderada
III	Periodontite Severa com possibilidade de perda de peças dentárias
IV	Periodontite Severa com possibilidade de perda de toda a dentição

Os Estádios classificados entre I a IV e prendem-se com a severidade e complexidade da abordagem/tratamento assim como a extensão e distribuição da doença, já os Graus de A a C dizem respeito ao risco de progressão rápida e prognóstico de resposta ao tratamento (Caton et al., 2018).

Tabela 2: Nova classificação do estágio da periodontite e seus condicionantes (Adaptado de Panos Papanou et al. e Tonetti et al. em 2018).

Estádio		I	II	III	IV
Severidade	Nível de inserção clínica	1 a 2 mm	3 a 4 mm	≥ 5 mm	≥ 6 mm
	Osso perdido em Raio-X	Terço coronário (<15%)	Terço coronário (15-35%)	Extensão a meio da raiz ou superior	Extensão ao terço radicular ou superior
	Dentes perdidos	Sem dentes perdidos devido à periodontite		≤4 dentes perdidos devido à periodontite	≥5 dentes perdidos devido à periodontite
Complexidade	Local	PS ≤ 4 mm; Perda óssea maioritariamente horizontal	PS ≤ 5 mm; Perda óssea maioritariamente horizontal	PS ≥ 6 mm; Perda vertical de osso; Presença de defeitos de furca II e III; Defeitos de crista óssea moderados	Necessidade de reabilitação complexa por: Disfunção Mastigatória; Trauma oclusal secundário; Mobilidade dentária severa (≥2); Colapso de mordida; Menos de 20 dentes remanescentes em boca.
Extensão e distribuição	Adicionar ao estágio	Para cada estágio deveremos classificar em generalizada, localizada ou padrão de molar-incisivo			

Tabela 3: Nova classificação do grau da periodontite e seus condicionantes (Adaptado de Panos Papapanou et al. e Tonetti et al. em 2018).

Grau			Grau A Baixo risco de progressão	Grau B Moderado risco de progressão	Grau C Alto risco de progressão
Primeiro Critério	Evidência direta de progressão	Informação longitudinal de perda óssea (Rx ou CAL)	Nenhuma perda óssea em 5 anos	< 2 mm em 5 anos	≥ 2 mm em 5 anos
	Evidência indireta de progressão	% perda óssea/idade	< 0,25	0,25 - 1	> 1
		Fenótipo do caso	Biofilme marcado por depósitos densos, com baixo nível de destruição	Depósitos de biofilme proporcionais com destruição	Destruição superior ao que seria expectável pelos depósitos de biofilme; Período de rápida progressão ou doença de início precoce.
Agravadores de Grau	Fatores de Risco	Hábitos Tabágicos	Não Fumador	< 10 cigarros por dia	> 10 cigarros por dia
		Diabetes	Normoglicémico	HbA1c < 7% em diabéticos	HbA1c ≥ 7% em diabéticos

O tratamento da doença periodontal passa pela remoção e controlo clínico da placa bacteriana e tártaro, através de utensílios mecanizados ou manuais, podendo mesmo em casos mais severos optar-se por tratamento cirúrgico (Pihlstrom et al., 2005).

A Periodontite pode ser controlada (Tonetti et al., 2015). De entre os métodos existentes para a prevenção da doença a escovagem por parte do paciente torna-se um dos meios mais valiosos devendo ser associada a consultas periódicas de remoção de biofilme em consultório (Drisko, 2001). Como se trata de uma patologia multifatorial, o indivíduo deve ser instruído dos fatores de risco que a ela podem estar associados e que devem ser controlados, como são exemplo o tabaco e a diabetes (Pihlstrom et al., 2005; Tonetti et al., 2015).

3.1. Fatores de Risco para a Doença Periodontal

Mesmo que a doença periodontal esteja dependente de biofilme dentário (Tonetti et al., 2015), nem todo o quadro de gengivite evolui necessariamente para um quadro de periodontite, uma vez que a periodontite está também relacionada com a suscetibilidade do indivíduo caracterizada por um conjunto de fatores de risco (Chapple et al., 2015).

Descrevem-se inúmeros fatores de risco para a doença periodontal entre os quais a acumulação de placa bacteriana, o alcoolismo, doenças sistêmicas – *Diabetes mellitus* –, tabagismo, nutrição deficiente ou mesmo *stress* (Chapple et al., 2015).

Escudero-Castaño e colaboradores, em 2008 enunciaram que para a doença periodontal existem fatores de risco adquiridos como a diabetes e outras doenças imunossupressoras como a infecção pelo vírus HIV, ou até mesmo fármacos (antiepiléticos e imunossupressores) que provocam o aumento do volume gengival e facilitam a acumulação de placa bacteriana. Os autores referiram também, como fatores de risco, fatores locais que se evidenciam como apinhamentos dentários, pontos de contacto entre dentes adjacentes abertos, restaurações debordantes e perfurações radiculares.

A placa bacteriana é considerada como o fator de risco mais comum para o desenvolvimento da Periodontite (Garlet et al., 2012), no entanto a doença é multifatorial onde a microbiologia, a resposta imune do indivíduo e outros fatores locais e sistêmicos são responsáveis pelo seu desenvolvimento (Zaveri, Rathva, Sant, & Dave, 2016).

As bactérias são um fator necessário para a Periodontite, no entanto os fatores de risco do indivíduo doente podem, em inúmeros casos ter maior influência para que a doença se desenvolva (Page & Kornman, 1997).

Apesar da infecção periodontal ser de cariz polimicrobiano e envolva bactérias Gram-positivo e Gram-negativo, são as últimas que ganham ênfase na literatura como os patogênicos fulcrais da doença: *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Escudero-Castaño et al., 2008). É este grupo de bactérias que demonstra uma associação forte com a severidade da doença (Socransky & Haffajee, 2005) e que estão relacionadas com as características clínicas da mesma, como a hemorragia à sondagem ou a profundidade das bolsas (Grenier et al., 2009).

A doença periodontal depende de uma mudança dos micro-organismos presentes, sendo que a transição para um estado onde espécies de bactérias Gram-negativo ganham em número às Gram-positivo, se demonstra responsável pela passagem de um estado de “saúde” para um estado de “doença” (Marsh 1994, Darveau 2010).

Fatores de Risco sistêmicos e ambientais

a. Hábitos Tabágicos

Um ponto importante a ressaltar é que o tabaco, por si só não causa doença periodontal (Weyant et al., 1999).

No entanto num estudo que avaliava três grupos: indivíduos que nunca fumaram, indivíduos que fumam <10 cigarros por dia e fumadores de >10 cigarros por dia; foi evidenciado que o grau de periodontite é mais severo em sujeitos com hábitos tabágicos regulares, sendo o número de cigarros determinante (Haber et al., 2010).

A nicotina é um agente vasoconstritor que afeta o volume do fluido gengival, provocando a produção de interleucina 6 e 8 pelos fibroblastos do ligamento periodontal (Haffajee et al., 2001). A resposta imune da gengiva torna-se deficiente em fumadores, onde se denota uma diminuição de linfócitos T helper, Linfócitos B e produção comprometida anticorpos, nomeadamente IgA e IgG (Al Ghamdi & Anil, 2007).

O tabaco provoca ainda um acréscimo de citocinas inflamatórias, pelo que o tratamento periodontal, quer ele seja não cirúrgico ou cirúrgico é comprometido pelos hábitos tabágicos (Rosa et al., 2014), uma vez que há diminuição da adesão celular, dependendo do número de cigarros fumados diariamente (Haffajee et al., 2001).

b. Stress ou depressão

O stress está muitas vezes associado a quadros depressivos e pode ter um papel relevante na doença periodontal, uma vez que induz alterações comportamentais (Kinane, 1999). O stress não só compromete a resposta imune do indivíduo como também pode ser responsável pela adoção de hábitos menos saudáveis como alterações na dieta,

aumento do consumo de tabaco, alterações nos hábitos de higiene oral, consecutivamente haverá um aumento da placa bacteriana, o que agrava o risco para a periodontite (Escudero-Castaño et al., 2008).

c. Distúrbios Hematológicos

As doenças hematológicas representam um fator de risco para a doença periodontal, aumentando a suscetibilidade para esta patologia (Kinane, 1999).

Os leucócitos polimorfonucleados podem causar dano tecidual a nível periodontal, o que em muitos estudos se refere à sua atividade protetora.

Indivíduos que apresentem distúrbios hematológicos, sejam eles relativos à qualidade dos polimorfonucleados ou quantidade (neutropenia ou agranulocitose) demonstram destruição severa dos tecidos periodontais (Kinane, 1999).

d. Diabetes mellitus não controlada

A doença periodontal foi classificada como a sexta complicação da Diabetes (Løe, 1993). Perante numerosas revisões sobre o relacionamento das duas patologias, torna-se possível inferir que há uma relação direta entre a *Diabetes mellitus* e a Periodontite (Rees, 1994).

Concluindo, as bactérias são indispensáveis para que a Doença Periodontal se desenvolva, no entanto em diversos casos não se demonstram suficientes para explicar certos traços da mesma (Saygun et al., 2008; Chalabi et al., 2010; Kato et al., 2013; Zaveri et al., 2016). A Periodontite é, como antes referido uma doença multifatorial, onde a microbiologia, a resposta imune do indivíduo e outros fatores locais e sistémicos são responsáveis pelo seu aparecimento e progressão (Zaveri et al., 2016).

Esta patologia é marcada por um aumento de microrganismos específicos ou pelo crescimento de espécies microbianas acima de um valor normal, relacionado com uma redução da resposta imune do indivíduo, via um número de fatores, sistémicos, ambientais ou genéticos que influenciam o seu desenvolvimento (Faria Almeida et al., 2013).

Apesar de todos os estudos e investigações, existem ainda dúvidas acerca das variações de progressão da doença e falta de clareza sobre o seu processo infeccioso (Slots et al., 2003), para determinar com clareza a sua etiopatogenia e a sua evolução clínica (Monzón et al., 2011).

3.2. Tratamento da doença periodontal

Entre os anos de 2005 e 2006 a Academia Americana de Periodontologia recomendou a utilização de certas diretrizes que deveriam ser seguidas para o doente periodontal, enfatizando que patologias sistémicas devem ser controladas, assim como fatores locais orais como restaurações debordantes devem ser polidas.

A principal causa da inflamação dos tecidos periodontais é bacteriológica, sendo que o objetivo primordial do tratamento periodontal é o controlo da placa bacteriana. Desta forma, a eliminação de tártaro e biofilme assim como a atenuação de fatores locais (irregularidades, rugosidades, cáries) que a possam proporcionar, se torna importante para um futuro sucesso terapêutico. Esta é por isso, a primeira fase do tratamento. (Newman et al., 2006).

A primeira fase do tratamento periodontal consiste na eliminação de todos os fatores de risco locais e sistémicos possíveis, assim como a eliminação de tártaro e placa presentes. É uma fase didática para o paciente onde lhe é explicado formas e instrumentos mais eficazes de escovagem dentária, dotando-o de habilidades para que este possa assegurar uma boa higiene oral diariamente, o que é importante em todas as fases de tratamento. O alisamento radicular e a destartarização são os procedimentos clínicos utilizados nesta fase, procurando obter contornos das superfícies dentárias regulares e evitando a acumulação de placa (Faria Almeida et al., 2013).

A segunda fase do tratamento é a reavaliação, onde é feita uma nova análise periodontal do paciente, avaliam-se o índice de placa, índice gengival, profundidades de sondagem, mobilidades dentárias entre outros fatores determinantes (Newman et al., 2006). É nesta fase que se avalia a necessidade cirúrgica ou terapias de suporte periodontal com reabilitações estéticas, se necessário (Chavez-Vereau & Alarcón Palacios, 2012).

A terceira fase é a fase cirúrgica, para paciente que necessitem desta após o tratamento inicial – supuração evidente, aumento das profundidades de sondagem e hemorragia à sondagem. O objetivo é alcançar zonas de difícil acesso recuperando uma anatomia que permita uma higiene oral mais eficiente (Bascones Martinez & Figueiro Ruiz, 2005).

Após o tratamento e reavaliação, caso os pacientes se apresentarem periodontalmente estáveis, entram numa fase importante de manutenção periodontal. As consultas nesta fase são de carácter periódico e são necessárias para o controlo e reavaliação do estado periodontal do indivíduo. Caso exista tártaro ou placa este deve ser eliminado. Se perante a reavaliação periódica se evidenciar a reativação da doença, os locais afetados devem ser tratados (Faria Almeida et al., 2013).

Um grupo de indivíduos portadores da doença Periodontal continuam a apresentar progressão da doença mesmo após tratamento convencional, desta forma persistem campos de investigação para intentar conhecer mais pormenorizadamente a etiopatogenia e a evolução clínica da patologia (Monzón et al., 2011), uma vez que existem variações significativas no curso da mesma e informação insuficiente sobre o seu processo infeccioso (Slots et al., 2003). O principal objetivo do tratamento no doente periodontal é o alcance e manutenção de um estado de função e saúde dos tecidos de suporte dentários (Greenwell 2001).

4. Os Vírus

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios que apresentam DNA – cadeia dupla ou simples – ou RNA. Utilizam energia e macromoléculas das células do hospedeiro para replicação do seu material genético com fim à produção de proteínas virais, que são posteriormente libertadas no meio extracelular (Olsen, Krakowka, & Blakeslee, 2019). Um vírus consiste então num genoma de ácido nucleico que se encontra envolto por uma capsíde – de natureza proteica – podendo, por vezes, apresentar um invólucro lipídico (Kumar, Abbas & Aster, 2013).

4.1 A Infecção Viral

A população humana vive a cada dia rodeada de seres microscópicos e é raro o indivíduo que se inteira do fato que as infecções por vírus como Herpes Simples, o Vírus Epstein-Barr e Citomegalovírus são mais comuns do que se possa imaginar. De acordo com a Organização mundial de Saúde estima-se que cerca de 67% da população mundial, abaixo dos 50 anos, se encontre infetada por vírus Herpes Simples 1 (HSV1) e que 11% dos indivíduos, dos 15 aos 49 anos, estejam infetados por HSV2 (Ortega, 2019).

Os vírus podem entrar no organismo hospedeiro por variadíssimas formas: por meio de inoculação (pela pele ou mucosas) pela picada de um inseto ou abrasão acidental; inalação (pelo trato respiratório) por aerossóis ou gotículas; ingestão por via gastrointestinal; ou por via génito urinária através de relações sexuais (Zaveri et al., 2016).

Os vírus são responsáveis por um grande número de infecções do ser humano, muitos deles causam doenças transitórias, como constipações, já outros não são eliminados do organismo, persistindo durante anos no interior de células do hospedeiro, de forma latente. Nestes casos, os vírus sofrem ativações periódicas que podem ter diferentes manifestações clínicas, leves ou severas, dependendo do estado do indivíduo hospedeiro, quer em idade ou mesmo em capacidade imunitária (Kumar, Abbas, & Aster, 2013).

Um vírus interage com uma célula do organismo hospedeiro através de proteínas na sua superfície que se ligam a proteínas específicas da membrana plasmática de células alvo. As características físicas do meio, como substâncias químicas e temperatura,

contribuem também para o tropismo tecidual. Uma vez feita esta ligação segue-se o passo da introdução do genoma viral na célula do hospedeiro, fator que varia consoante o tipo de vírus e o tipo de células, uma vez que a habilidade de replicação de material viral depende se a célula em questão contém componentes de transcrição específicos que reconhecem fatores virais potencializadores e promotores (Kumar, Abbas & Aster, 2013).

A interação entre as células do hospedeiro e um vírus pode variar, sendo que pode ocorrer: a lise da célula infetada; um estado onde múltiplos vírus são sintetizados e culminam na morte da célula hospedeira; um estado de latência onde a célula está infetada mas nenhum material genético viral está a ser replicado, podendo ser ativado a qualquer momento; ou a transformação da célula normal numa célula neoplásica (Olsen, Krakowka, Blakeslee, 2019).

A interação viral com as células do hospedeiro pode então dividir-se em Permissiva e Não Permissiva. Na primeira forma, a interação resulta na lise celular após a síntese de componentes virais, onde geralmente, ocorre o desarranjo do retículo endoplasmático durante a montagem viral, culminado na ativação de caspases que medeiam a apoptose (Kumar, Abbas & Aster, 2013). Já na segunda, a infeção resulta numa transformação a nível celular, onde normalmente há a integração de material genético viral no genoma do hospedeiro, no entanto a célula continua viva, podendo resultar em ativações virais futuras (Zaveri et al., 2016).

Após a interação vírus-célula hospedeira proteínas virais podem ser dispostas na membrana celular da célula afetada e estas serem reconhecidas por Linfócitos T citotóxicos, que se demostram importantes na regulação de infeções virais. No entanto estes agentes podem também, ser responsáveis por lesões teciduais locais no foco de infeção (Kumar, Abbas & Aster, 2013).

Dentro da família Herpesviridae são identificados 8 vírus que infetam o ser humano, como Herpes Simples 1 (HSV1), Herpes Simples 2 (HSV2), Citomegalovírus (CMV) e o vírus Epstein- Barr (EBV) (Ortega, 2019).

4.2 Resposta Imune do Hospedeiro

A resposta imunológica divide-se em inata e adaptativa sendo que ambas são essenciais à prevenção da disseminação e replicação de vírus e outros micro organismos no indivíduo hospedeiro (Zmora, Bashiardes, Levy, & Elinav, 2017).

Aquando de uma infeção viral dá-se a ativação de um fator nuclear denominado KappaB, que promove a expressão de proteínas pro inflamatórias (citoquinas) que recrutam células Natural Killer e macrófagos para o foco de infeção, quimiocinas e moléculas que permitem adesão às células nas quais ocorreu infeção viral. O sistema imunitário inato, fonte de citoquinas pro inflamatórias – interleucinas 1, 6, 12 e 18 –, linfócitos T helper, fatores de necrose tumoral e interferões, ocupa-se de promoção da lise de células infetadas. Uma vez ativado o sistema imune inato, este leva à ativação conseguinte do sistema imune adaptativo, onde linfócitos T citotóxicos CD8+, representam a sua principal fonte de defesa (Escalona & Limonchy, 2009).

Na fase inicial de uma infeção viral, o controlo é feito por interferões I, IFN- α e IFN- β , células Natural Killer e macrófagos. Os interferões do tipo I são produzidos pelas células dos tecidos infetados e servem de proteção às células vizinhas e colaboram com a resposta adaptativa (Machado, Araújo, Cravalho & Cravalho, 2004).

Outra molécula relevante é o IFN γ que ativa células *Natural Killer* e macrófagos, que atuam na destruição de células infetadas. Os macrófagos, juntamente com outras células infetadas, produzem interleucina-12 que estimulam células *Natural Killer* e estimulam à produção de IFN γ , o que eleva o potencial microbicida de macrófagos (Machado, Araújo, Cravalho & Cravalho, 2004).

O processo de imunidade adaptativa dá-se essencialmente por Linfócitos T citotóxicos CD8+ que reconhecem antigénios virais nas células infetadas e consecutivamente atuam na indução da sua lise. Os linfócitos T CD4+ são também relevantes, uma vez que colaborando com linfócitos B produzem anticorpos – imunoglobulinas A, G e M – (Klimpel, 1996), que após a replicação viral, e apesar dos vírus serem parasitas intracelulares, quando uma célula infetada sofre lise com consequente libertação de vírus estes são imediatamente reconhecidos por anticorpos e neutralizados, impedindo a progressão da infeção. No entanto, os anticorpos podem ainda

reconhecer células infetadas, ligando-se a elas podendo as células *Natural Killer* efetuar a sua ação fagocítica (Machado, Araújo, Cravalho & Cravalho, 2004).

4.3 Herpes Vírus Simples 1 e Herpes Simples 2

Os Vírus herpes simples 1 e 2 são vírus que apresentam DNA como material genético e que infetam na maioria dos casos células da pele e mucosas (Cappuyns et al., 2005; Ortega, 2019). A infecção por vírus herpes simples (HSV1 e HSV2) é altamente comum (Montgomery, Warner, Lum, & Spear, 1996).

Os vírus Herpes Simples são vírus com capacidade de infetar células nervosas – neurotrópico – embora causem principalmente infecções orais, podem ainda causar lesões oculares, no nariz ou genitais. O vírus HSV2 é um vírus similar ao tipo 1, no entanto causa essencialmente lesões ano-genitais (Montgomery, Warner, Lum, & Spear, 1996; Sushma et al., 2012; Ortega, 2019).

Tanto o vírus HS1 como o HS2 causam geralmente a morte celular, sendo altamente contagiosos aquando dos seus ciclos líticos (Ortega, 2019). No epitélio onde ocorre a infecção os antigénios virais induzem a resposta imune do hospedeiro mediada por células, o que poderá levar à lise de células comprometidas ou à indução de um período de latência caso a expressão de proteínas virais a partir de DNA viral seja suprimida (Cappuyns et al., 2005).

O vírus HSV-1 é detém a capacidade de infetar células da cavidade oral como queratinócitos e fibroblastos gengivais, estando associado a gengivoestomatites herpéticas primárias e recorrentes (Zaveri et al., 2016), tendo inclusive sido identificado em Linfócitos T e macrófagos num estudo conduzido em indivíduos com periodontite (Hung et al., 2012).

Posteriormente à replicação a infecção por estes vírus torna-se latente a nível de gânglios periféricos, podendo ocorrer a sua reativação causando lesões recorrentes (Montgomery et al., 1996).

O vírus Herpes Simples pode ter associação com a doença periodontal, uma vez que induz a produção de citocinas pró-inflamatórias que se demonstram como fatores coadjuvantes do crescimento de bactérias periodontopatogénicas (Slots, 2000).

4.4 Vírus Epstein-Barr

O vírus Epstein-Barr (EBV) é um dos vírus mais prevalentes entre os seres humanos, persistindo durante toda a vida do indivíduo (Cohen, 2000). A infecção por este tipo de vírus localiza-se essencialmente a nível oral e orofaríngeo podendo ser consequência de transmissão via saliva ou sangue infetado. É o vírus responsável, quando infeta adultos e adolescentes pela conhecida “doença do beijo” – mononucleose – no entanto em crianças até aos dois anos, a infecção é clinicamente assintomática (Ortega, 2019).

O vírus consiste numa molécula de DNA linear, que codifica cerca de 100 proteínas virais, que quando replicadas pela célula do hospedeiro resultam na lise da célula epitelial (Cohen, 2000).

A replicação de Epstein-Barr dá-se ao nível de células epiteliais orofaríngeas sendo que a infecção se torna latente quando passa das células do epitélio para linfócitos B, sendo estes a maior fonte de persistência do vírus (Babcock, Decker, Volk & Thorley-Lawson, 1998).

Existem dois tipos de Epstein-Barr, EBV1 e EBV2, sendo que o segundo está fortemente ligado a paciente seropositivos e imunodeprimidos e o primeiro com indivíduos saudáveis tendo sido associado à doença periodontal (Chalabi et al., 2008). Em 2013, Kato considerou que a sua reativação em regiões periodontalmente comprometidas seria um fator importante no desenvolvimento da doença periodontal. Sendo que os mecanismos não estejam esclarecidos ainda, é incontestável a deteção elevada do vírus em fluido crevicular ou tecido gengival de indivíduos com doença periodontal, quando comparadas regiões orais periodontalmente comprometidas com regiões sãs (Escalona & Limonchy, 2009).

Estudos feitos com auxílio de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), mostram que existe uma relação muito próxima entre o vírus CMV e EBV e patógenos periodontais como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella nigrescens*, *Treponema denticola* e *Prevotella intermedia* (Imai, Inoue & Tamura et al., 2012). Investigações recentes mostram ainda que a *Porphyromonas gingivalis* induz a ativação da replicação do vírus EBV via modificação de cromatina. Um dos genes reguladores da passagem de fase latente para a fase ativa de replicação de EBV, é o gene que codifica a

proteína Zebra, proteína que a *Porphyromonas gingivalis* induz a que seja sintetizada, culminado na reativação viral (Imai, Inoue & Tamura et al., 2012).

4.5 Citomegalovírus

O vírus Citomegalovírus (CMV) é altamente prevalente na população humana (Gámez, Ruiz & Marí, 2014). Existem para este vírus diferentes genótipos que variam nas suas patogenicidades e onde a sua prevalência varia consoante a geografia e etnicidade do indivíduo (Wu et al., 2007).

Quando infeta indivíduos imunocompetentes ocorre de forma assintomática ou com manifestações clínicas leves, sendo que após a primeira infeção passa a um estado de latência podendo ocorrer infeções recorrentes pela sua reativação. No entanto para indivíduos imunodeprimidos (seropositivos ou transplantados) a infeção é bastante severa, resultando em sequelas graves ou até mesmo morte (Gámez, Ruiz & Marí, 2014).

A principal forma de infeção por CMV é congénita ou perinatal, ocorrendo por transmissão materna via placenta, aquando do parto ou mesmo através da amamentação. Este vírus infeta um largo número de células, tais como epiteliais, células do músculo liso, mesenquimatosas, hepatócitos, granulócitos, macrófagos e, por conseguinte, pode ser encontrado em saliva ou urina (Cappuyns et al., 2005).

Relativamente aos tecidos periodontais, o vírus infeta Linfócitos T e macrófagos/monócitos (Wu et al., 2007) sendo um dos vírus mais frequentemente encontrados em bolsas periodontais (Botero et al., 2008).

Estudo feitos com auxílio ao teste *Polymerase Chain Reaction*, mostram que existe uma relação muito próxima entre o vírus CMV e EBV e patogénicos periodontais como *P. gingivalis*, *Tannerella Forsythia*, *Prevotella nigrescens*, *Treponema Denticola* e *Prevotella Intermedia* (Imai, Inoue & Tamura et al., 2012).

4.6. Influência dos Vírus da família *Herpesviridae* na resposta imune do hospedeiro

Os vírus podem perturbar a resposta imune do hospedeiro utilizando processos específicos celulares e condicionar a função antiviral do organismo alvo (Saygun et al., 2008).

Diversos vírus como HSV, EBV e CMV podem produzir fatores que reduzem o potencial dos linfócitos citotóxicos T CD8+ e linfócitos auxiliares CD4+ de reconhecer células infetadas. Este mecanismo passa pela sua ligação ao complexo de histocompatibilidade principal (MHC) ou alterar a sua localização, o que consecutivamente compromete a sua apresentação a linfócitos CD8+. Para as células *Natural Killer* estes vírus podem ainda expressar homólogos de MHC, mas que atuam como inibidores destas células. Para além do MHC principal existe ainda um secundário ou classe II sobre o qual os vírus atuam na sua degradação, impedindo que sejam exibidos os antígenos aos linfócitos T auxiliares CD4+. Para além disto, os vírus podem ainda infetar leucócitos, o que compromete a sua função. Consequentemente à infeção por vírus da família *Herpesviridae*, denota-se uma diminuição da capacidade fagocítica e microbicida de leucócitos (Kumar, Abbas & Aster, 2013).

5. PCR (*Polimerase Chain Reaction* ou **Reação de polimerização em Cadeia**)

A Biologia Molecular veio alterar os métodos de detecção de vírus, trazendo numerosas vantagens, entre as quais se destacam alta precisão, sensibilidade e rapidez, uma vez que os resultados estão normalmente disponíveis cerca de três dias após a colheita.

Estas técnicas foram adotadas em laboratórios e clínicas para a possibilitar a identificação de vírus, sendo que a mais utilizada é a amplificação de ácidos nucleicos (Das & Chakraborty, 2018).

Foi em 1869 que Johann Friedrich Miescher conseguiu isolar pela primeira vez DNA, mas apenas 70 anos depois a estrutura de DNA foi descrita por Watson e Crick como uma dupla hélix (Maheaswari, Kshirsagar, & Lavanya, 2016).

Em 1983 Kary Mullis, desenvolveu a técnica de PCR ou Polymerase Chain Reaction, reação esta que permite a partir de uma única cópia de DNA gerar inúmeras cópias de uma sequência específicas (Das & Chakraborty, 2018). Por esta descoberta venceu o prêmio Nobel da Química em 1993. Nas história da medicina foi posto em prática pela primeira vez para detetar eritrócitos anómalos (anemia falciforme) (Maheaswari et al., 2016).

O PCR é uma técnica *in vitro* que permite a amplificação e estudo de um organismo a partir de uma vasta seleção de tecidos: sangue, pele, saliva, fluido crevicular, entre outros. Para o teste é portanto, necessário a utilização de uma amostra de DNA, dois primers (um *reverse* e outro *forward*), nucleótidos e DNA polimerase (Maheaswari et al., 2016).

Mas não só é utilizado nos campos médicos e de análises clínicas como também pode ser utilizado por motivos forenses, como em 1992 onde foi utilizado para a identificação de DNA do tecido da polpa de um dente humano (Maheaswari et al., 2016).

Pela primeira vez em 1993 no campo da Periodontologia foram identificadas bactérias patogénicas – *Porphyromonas gingivalis* – em amostras de placa subgingival com auxílio do teste de PCR. Foi apenas o começo da aplicação deste teste no campo da Medicina Dentária que utilizando as suas várias variações (Tabela 4.) – *Nested PCR*, *Multiplex PCR* entre outros – contribuiu para uma melhor compreensão de microrganismos presentes, tendo como exemplo a investigação que teve lugar em 2005

onde se mapeou todo o espectro bacteriano presente em amostras de placa bacteriana (Maheaswari et al., 2016).

Tabela 4: Vantagens e desvantagens de 3 tipos de técnicas de PCR (adaptado de Ambili et. al. 2013).

Técnica de PCR	Vantagens	Desvantagens
PCR Nested	Deteta quantidades muito reduzidas de bactérias ou DNA viral	Sujeito a contaminação, não se consegue saber a viabilidade ou quantidade do organismo
PCR Multiplex	Podem ser detetados múltiplos microrganismos ao mesmo tempo.	Dificuldade na amplificação de microrganismos não específicos.
PCR Real Time	Reprodutibilidade; especificidade; Quantitativo; Menos contaminação; Rápido	Menos sensível que o PCR Nested.

Adicionalmente, o teste PCR Multiplex evidencia-se como uma ferramenta bastante útil na identificação de vírus (Heredia et al., 1996).

6. PCR para avaliação da presença de determinado microrganismo

A amostra de DNA colhida necessita de ser previamente tratada, ou seja, é necessário que se proceda primeiramente à extração do DNA da amostra, o que pode ser feito quimicamente, por calor ou mesmo por reações enzimáticas (Maheaswari et al., 2016).

Para proceder ao teste de PCR, é necessário um DNA modelo, tido como a “sequência alvo” que se quer amplificar, que varia entre 100 a 1000 pares de bases. Já os primers, tanto o *reverse* como o *forward*, têm como característica tratar-se de uma cadeia única com um número reduzido de pares de bases que normalmente se situa entre 16 a 20. Adicionalmente, necessita-se também de uma enzima – DNA polimerase – que se apresenta como a chave para a replicação do material genético, estabelecendo ligações entre nucleótidos para formar o produto final do PCR e consecutivamente permitirá a amplificação das sequências de DNA alvo da pesquisa (Maheaswari et al., 2016).

Seguidamente coloca-se a solução preparada no termociclador, equipamento que funciona em ciclos repetidos de diferentes temperaturas e potencia a replicação de DNA. No curso da replicação do material genético ocorrem três passos fixos: Desnaturação de DNA a 94 °C – onde a dupla cadeia é separada; Hibridação primário que ocorre entre os 50 e os 58° C e onde os primers (forward e reverse) se ligam a cadeias complementares diferentes em cada polo oposto; e Extensão dos primers utilizados, através da DNA polimerase que à volta de 72 °C permite a formação de novas cadeias complementares através dos primers (Maheaswari et al., 2016).

A colocação das misturas de PCR no Termociclador permite que todas as preparações passem por diversos ciclos sob as mesmas condições ótimas de tempo por ciclo e temperatura para que no final se obtenha idealmente moléculas do produto desejado (Maheaswari et al., 2016).

Após os ciclos estarem terminados existem diversas formas de analisar os produtos que foram amplificados e de os identificar: o mais simples é a eletroforese em gel de agarose ou em gel de poliacrilamida, onde os produtos aparecem como uma banda única que se torna evidente quando analisado à luz ultravioleta (Maheaswari et al., 2016).

7. Vírus e Doença Periodontal

Embora se consigam identificar mais de trinta mil vírus patogênicos, apenas cerca de 40 se demonstram medicamente relevantes (Ambili et al., 2013). Foi nos anos 90 que os vírus, nomeadamente HSV, EBV e CMV começaram a ser relacionados com a patogênese da doença periodontal (Contreras & Slots, 2000).

Quer seja a nível do tecido gengival, do fluído crevicular ou mesmo em amostras de placa subgengival, estes vírus são encontrados com bastante frequência em doentes periodontais (Cappuyns et al., 2005). Os vírus da família *Herpesviridae* podem ainda atuar por mecanismos distintos que permitem inferir a sua relação com a periodontite, nomeadamente a diminuição da eficácia da resposta imunitária do organismo hospedeiro, facilitam a colonização por parte de bactérias periodontopatogénicas, criam anticorpos contra neutrófilos causando infeções secundárias (Escalona & Limonchy, 2009), provocam dano tecidual e alteram mediadores inflamatórios (Contreras & Slots, 2000). Em suma os vírus podem invadir células do sistema imune periodontais, influenciando de forma negativa a resposta a infeções (Contreras, Zadeh, Nowzari & Slots, 1999).

Tanto HSV, como EBV e CMV provocam infeções latentes, cuja reativação periódica entra em consonância com o padrão de curso mais comum da doença periodontal (Slots et al., 2003).

Os vírus CMV e o EBV conduzem a uma expressão aumentada de IL-1 β e TNF- α (Fator de necrose tecidual) por parte de macrófagos e monócitos, por sua vez o TNF- α a IL-1 α têm a capacidade de estimular Metaloproteínases da matriz (MMPs) e diminuir os inibidores destas enzimas, mediando inevitavelmente a destruição de osso alveolar do periodonto (Escalona & Limonchy, 2009).

Após um estudo *in vitro* em fibroblastos gengivais infetados com CMV demonstrou-se uma maior atividade de metaloproteínases I e II e uma redução da expressão de mRNA codificante de colagénio I e III. Uma vez que os tecidos periodontais são essencialmente constituídos por colagénio é dedutível que alterações a este nível, conduzam a alterações nos tecidos do periodonto, resultem mesmo na formação de bolsas (Botero et al., 2008) ou prejudiquem a cicatrização de tecidos periodontais e ligamento periodontal, após tratamento clínico (Zaveri et al., 2016).

A infecção por vírus da família *Herpesviridae* encontra-se tipicamente associada a um aumento das bactérias periodontopatogénicas. Testes de PCR revelaram que tanto o vírus EBV como CMV têm associação com as bactérias *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, e *Treponema denticola*.

Estudos recentes mostram ainda que a *Porphyromonas gingivalis* tem a capacidade de induzir a produção da proteína viral ZEBRA do vírus EBV responsável pela sua reativação (Imai, Inoue & Tamura et al. 2012).

Atualmente define-se a hipótese de que uma infecção viral ativa pode desencadear uma depressão a nível dos tecidos periodontais. A indução da libertação de citocinas proinflamatórias ativa osteoclastos e metaloproteínases e inativa mecanismos antimicrobianos levando a um crescimento bacteriológico na região (Zaveri et al., 2016).

Os vírus não são vistos como o fator etiológico principal da doença, mas sim como coadjuvantes na sua severidade e progressão clínica. Em 2000 Slots e Contreras propuseram um modelo onde explicam que a periodontite poderá, em alguns casos, ter resultado direto com a infecção viral ou sua reativação, uma vez que esta resulta num aumento do nível de patogenia de baterias periodontopatogénicas (Figura. 2).

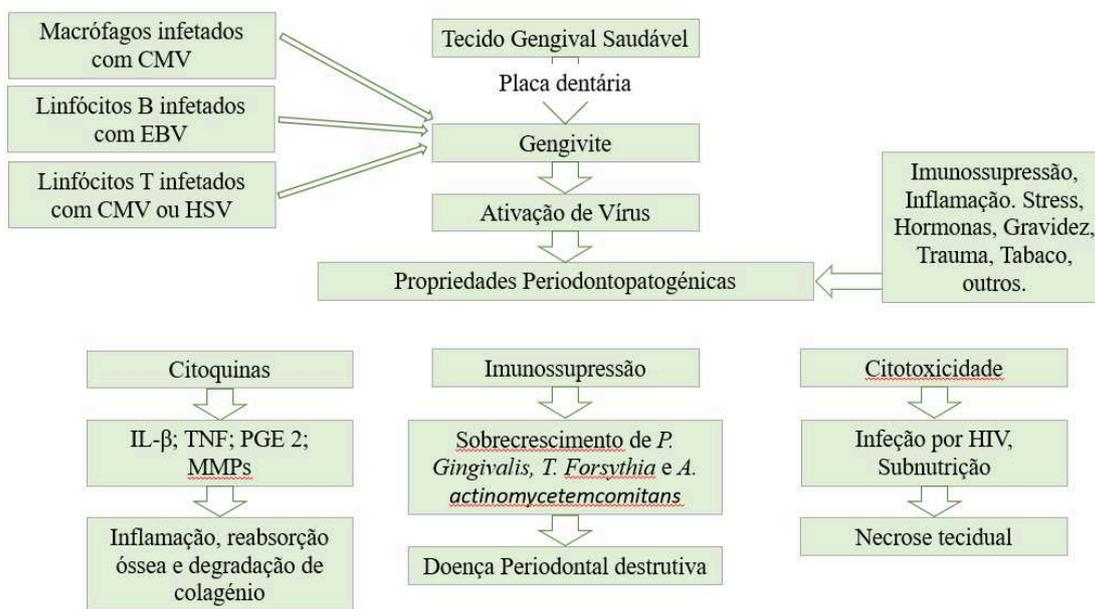


Figura 2: Modelo Proposto por Contreras & Slots em 2000 para o desenvolvimento da Periodontite mediada por vírus. Este demonstra a influência que os mesmos podem exercer sobre o equilíbrio do sistema.

8. Objetivos do estudo

Considerando que os vírus podem ser um fator de risco na patologia periodontal, conduziu-se uma investigação para pesquisar HSV1, HSV2, EBV e CMV em doentes periodontais.

O objetivo da presente investigação, conduzida na Clínica Universitária Egas Moniz, é averiguar a presença de vírus em bolsas periodontais de doentes com periodontite, comparando-os com os achados num grupo com periodonto saudável. Investiga-se a associação entre a doença periodontal e HSV1, HSV2, EBV e CMV. As amostras recolhidas para a pesquisa foram de fluído crevicular, posteriormente sujeitas a extração de DNA e teste de PCR *Multiplex* no Laboratório de Microbiologia Aplicada da mesma Instituição.

Através do teste estatístico Qui-Quadrado procurou-se uma associação entre duas variáveis, para escolha de uma de duas hipóteses:

H₀: As variáveis *doença periodontal* e *vírus* não estão relacionadas – o que no teste Qui-Quadrado corresponde a um valor de $p > 0,05$.

H₁: As variáveis *doença periodontal* e *vírus* estão relacionadas – o que no teste Qui-Quadrado corresponde a um valor de $p \leq 0,05$.

II. Materiais e Métodos

O presente estudo foi conduzido na Clínica Dentária do Instituto Universitário Egas Moniz, onde foram recolhidas 100 amostras de fluído Crevicular. Destas 100 amostras 50 correspondiam a indivíduos com o Periodonto Saudável e outras 50 com Doença Periodontal.

Foram aplicados critérios de exclusão para a participação no estudo, os quais se prendiam com infeção viral nos últimos 6 meses, medicação com antivirais nos últimos 6 meses e imunodepressão endógena ou exógena.

Os 50 indivíduos com Periodonto Saudável foram escolhidos nos diversos departamentos da Clínica Dentária Egas Moniz, através triagem cuidada por parte do Departamento de Triagem da Clínica Universitária Egas Moniz, sendo que no momento da colheita foram excluídos indivíduos que apresentassem sangramento gengival, compatível com gengivite assim como bolsas. Foram também colhidas amostras de indivíduos que compareceram ao departamento de Periodontologia e aos quais foi atribuído o diagnóstico de Periodonto Saudável.

Os 50 indivíduos com Doença Periodontal, aleatoriamente escolhidos, foram recrutados no departamento de Periodontologia do Instituto Universitários Egas Moniz, tendo sido colhidas as amostras de fluído Crevicular nas consultas que antecedem o tratamento periodontal como consulta de Diagnóstico ou consulta de Status radiográfico, tendo sido utilizados amostras de doentes que após Reavaliação continuassem a apresentar bolsas periodontais ativas.

Para a realização da investigação de pesquisa de vírus em bolsas periodontais foram utilizados 2 cones de papel estéreis de conicidade 35 por indivíduo, previamente esterilizados no departamento de esterilização da Clínica Dentária Egas Moniz (Bostriim et al., 2001). A esterilização dos cones de papel, para além do principal objetivo de eliminar microrganismos presentes aumenta ainda o seu potencial de absorção (Kubo, Gomes & Jorge, 2000).

Os cones de papel foram colocados em eppendorfes estéreis de 1,5mL e numerados, para que a cada participante fosse atribuído um número, que coincidissem com o número de questionário, para possível identificação posterior.

Para a obtenção da amostra de fluido Crevicular para o grupo de indivíduos doentes, foram utilizadas as 2 bolsas com maior profundidade de sondagem existentes em boca. No grupo com periodonto saudável foram utilizados igualmente 2 cones de papel posicionados nos sulcos gengivais de pré-molares e molares para a absorção de fluido gengival.

Para ambos os grupos o procedimento de obtenção de amostra foi semelhante: A gengiva foi seca com auxílio de um *sani-tip*, para remoção de saliva no local onde se iria coletar a amostra. Com a sonda periodontal mediu-se a profundidade de sondagem para confirmar a presença de bolsa e após confirmação foram colocados 2 cones de papel, 1 em cada bolsa com maior profundidade de sondagem, por 30 segundos (Bostriim et al., 2001).

Após os 30 segundos os cones foram removidos e colocados no eppendorf estéril correspondente para futura análise laboratorial, para a identificação de vírus com auxílio da técnica de PCR.

No Laboratório de Microbiologia Aplicada do Instituto Universitário Egas Moniz procedeu-se primeiramente à extração do DNA presente nas 100 amostras, sendo que para cada amostra individualmente foi aplicado o mesmo protocolo.

A cada eppendorf foi adicionado, com auxílio de uma micropipeta, 1mL de água Ultrapura e incubou-se à temperatura ambiente por 30 minutos. Seguidamente agitou-se no vortex por 10 segundos utilizando uma rotação baixa (Figura 3) e centrifugou-se por 3 minutos em velocidade de 14 000 rotações por minuto (rpm) (Figuras 3). Após centrifugação retirou-se cuidadosamente o sobrenadante para não danificar o sedimento obtido após centrifugação (*pellet*) (Manual Prático de Biologia Molecular Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, 2012).



Figura 3: A e B: centrífugadora utilizada e C: vortéx utilizado para preparação das amostras perante o procedimento de extração de DNA.

Após a remoção do sobrenadante adicionou-se 200 μ L de solução de Chelex a 5% colocando-se imediatamente nem banho-maria a 56 °C por 15 minutos.

Passados os 15 minutos as amostras foram retiradas e agitadas novamente no vortex por 10 segundos a uma rotação alta. De seguida, e com auxílio de uma agulha esterilizada furou-se a tampa de cada eppendorf e colocaram-se os mesmos em suportes flutuantes, para os levar água em ebulição por 8 minutos, não deixando ultrapassar este tempo.

Posteriormente, agitaram-se os tubos novamente no vortex por 10 segundos e centrifugou-se, uma vez mais, a 14 000rpm por 3 minutos.

O procedimento de extração de DNA ficou assim terminado, tendo as amostras finais sido conservadas a -20 °C para futura utilização (Manual Prático de Biologia Molecular, Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, 2012).

Posteriormente procedeu-se ao teste de PCR para pesquisa de vírus CMV, EBV, HSV1 e HSV2.

Para a preparação das soluções de PCR foram necessários primers. Para cada vírus a pesquisar utilizaram-se um primer reverse e um forward (Tabela 5) (Kazi, Bharadwaj, Bhat & Happy, 2015):

Tabela 5: Primers, forward e reverse, para amplificação de cada vírus pesquisado (adaptado de Kazi et al., 2015)

Vírus	Primer	Pares de Bases
HSV1	Forward: 5'-CGTACCTGCGGCTCGTGAAGT-3'	21
	Reverse: 5'-AGCAGGGTGCTCGTGTATGGGC-3'	22
HSV2	Forward: 5'-TGGTATCGCATGGGAGACAAT-3'	21
	Reverse: 5'-CTCCGTCCAGTCGTTTATCTTG-3'	22
CMV	Forward: 5'-ACGTGTTACTGGCGGAGTCG-3'	20
	Reverse: 5'-TTGAGTGTGGCCAGACTGAG-3'	20
EBV	Forward: 5'-AGCACTGGCCAGCTCATATC-3'	20
	Reverse: 5'-TTGACGTCATGCCAAGGCAA-3'	20

Foram preparadas soluções de cada primer com concentração de 10 μ M e conservados a -20 °C até futura utilização.

Todos os procedimentos foram efetuados com os reagentes colocados em gelo (figura 4).

A mistura de reação utilizada foi: 25 μ L de *Taq Polymerase MasterMix* (Nzytech), 1 μ L de cada primer, 14 μ L de água ultrapura (Sigma), e 3 μ L de DNA (tendo o DNA sido adicionado numa bancada diferente e afastada do local onde se preparou a restante mistura).

Foram sempre utilizados Brancos (controlos negativos), que garantiam que a experiência decorria sem contaminações, onde os 3 μ L de DNA eram substituídos por 3 μ L de água ultrapura.

Não foi possível a utilização de controlos positivos, por não existir disponível no laboratório DNA dos vírus pesquisados.

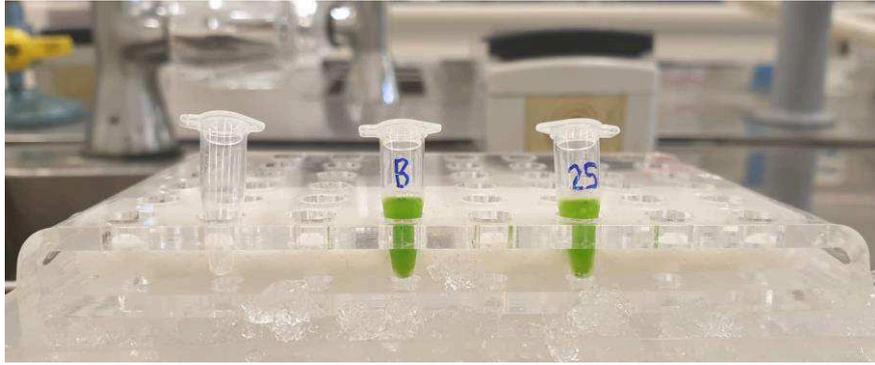


Figura 4: Eppendorfes utilizados na experiência em base de gelo, respetivamente rotulados para posterior identificação. Na figura temos um dos testes brancos (B) e a preparação correspondente ao DNA extraído da amostra número 25 (25).

Os tubos com as preparações foram colocados no termociclador e iniciou-se o programa definido.

As condições de PCR utilizadas foram: 95 °C por 5 minutos para a desnaturação inicial; 45 ciclos, onde cada ciclo é composto por 30 segundos a 95°C (desnaturação), 30 segundos a 54 °C (hibridação) e 30 segundos a 72 °C (extensão); e a extensão final à temperatura de 72°C durante 5 minutos (Kazi, Bharadwaj, Bhat & Happy, 2015). O programa tinha uma duração aproximada de 2 horas e meia.

As amostras foram aplicadas num gel de agarose 2% (4g de agarose + 200ml de TAE + 10µL de RedSafe) (Figura 5 e 6).



Figura 5: Gel de Agarose após solidificação com um pente de 22 poços.

Foram utilizados dois marcadores de pesos moleculares, o V e o VI (Nzytech) que ao possuírem bandas na ordem dos 200 pares de bases (pb), 300pb e 400pb permitem uma melhor identificação dos vírus pesquisados. Os tamanhos esperados das bandas dos respectivos vírus são indicados na tabela 6. (Kazi, Bharadwaj, Bhat, Happy, 2015).

Tabela 6: Tabela representativa do vírus e as suas respectivas pares de base.

Vírus	Banda
HSV1	271 pb
HSV2	231 pb
CMV	368 pb
EBV	326 pb



Figura 6: Disposição das amostras no gel de Agarose. Na figura observamos a colocação do Marcador V (V), do Marcador VI (VI) e do branco (B) isoladamente, as 10 amostras com ADN juntas sem poços de intervalo.

Utilizou-se uma potência de 50V para a eletroforese, sendo os resultados analisados posteriormente numa fonte de luz UV, imprimindo-se a fotografia para análise futura (Figura 7).



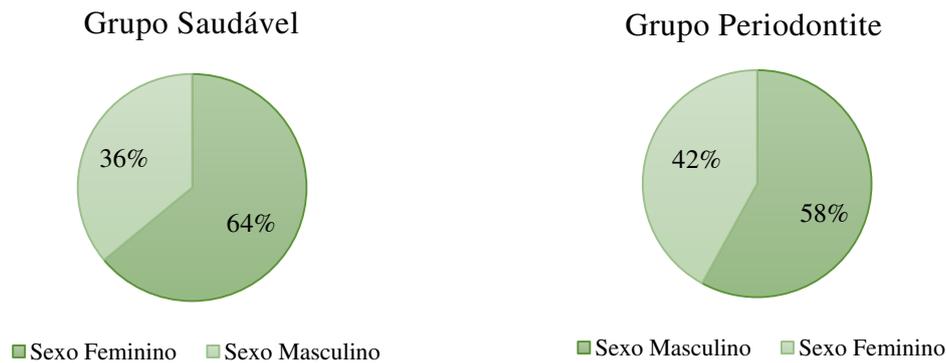
Figura 7: Gel de Agarose observado à luz UV onde se denotam bandas correspondentes à presença de DNA viral.

As fotografias dos resultados das 100 amostras foram analisadas uma a uma e os vírus encontrados registados numa tabela de Excel. A análise estatística foi executada recorrendo ao teste do Qui-Quadrado (Kazi et al, 2015).

III. Resultados

III.1 Caracterização da Amostra

Nos 50 indivíduos do grupo saudável, 18 são do sexo masculino e 32 do sexo feminino, já no grupo onde se inserem 50 doentes periodontais temos 21 indivíduos do sexo feminino e 29 do sexo masculino (Gráficos 1 e 2). Os participantes têm idades compreendidas entre 25 e 55 anos.



Gráficos 1 e 2: Distribuição dos participantes do estudo por género no grupo saudável (n=50) e doente periodontal (n=50).

Aquando da recolha dos dados foi feito um questionário onde se figuravam alguns hábitos dos indivíduos: A idade, hábitos de higiene oral, presença ou ausência de diabetes, hábitos alcoólicos e hábitos tabágicos.

No grupo com Periodontite 26 são fumadores e 24 não possuem hábitos tabágicos, já no grupo saudável 19 fumam e 31 não (Gráficos 3 e 4).



Gráficos 3 e 4: Distribuição dos participantes do estudo de acordo com os hábitos tabágicos no grupo saudável (n=50) e doente periodontal (n=50).

Relativamente aos hábitos alcoólicos os indivíduos foram agrupados em hábitos alcoólicos diários, semanais e os que não bebem. Do grupo com Periodontite 10 bebem bebidas alcoólicas diariamente, 15 semanalmente e os restantes não possuem hábitos alcoólicos relevantes. Já no grupo saudável 3 bebem bebidas alcoólicas diariamente, 14 semanalmente e os restantes não possuem hábitos alcoólicos relevantes (Gráficos 5 e 6).



Gráficos 5 e 6: Distribuição dos participantes do estudo de acordo com os hábitos alcoólicos no grupo saudável (n=50) e doente periodontal (n=50).

No que respeita os hábitos de Higiene Oral, os indivíduos foram divididos em escovo de 0 a 1 vez, de 1 a 2 vezes ou de 2 a 3 vezes diárias. Perante os indivíduos com periodonto saudável. 3 escovam os dentes entre 0 a 1 vez diária, 9 escovam entre 1 a 2 vezes e os restantes 38 mantêm hábitos de higiene oral com escovagens diárias entre 2 a 3 vezes. No grupo de indivíduos com Doença Periodontal 6 escovam entre 0 a 1 vez, 12 relatam que mantêm hábitos de higiene oral de 1 a 2 escovagens diárias. Já os restantes deste grupo afirmam escovar os dentes entre 2 a 3 vezes ao dia (Gráficos 7 e 8).



Gráficos 7 e 8: Distribuição dos participantes do estudo de acordo com os hábitos de higiene oral no grupo saudável (n=50) e doente periodontal (n=50).

Apenas um dos sujeitos dos 100 analisados era diabético, sendo pertencente ao grupo dos doentes periodontais.

III.2 Pesquisa de Vírus

Nas 50 amostras de indivíduos saudáveis apenas 3 vírus foram encontrados, ou seja, dos indivíduos saudáveis apenas 6% apresentaram vírus nas amostras de fluido crevicular analisadas. Já no grupo de indivíduos com periodontite foram obtidas 51 pesquisas positivas, o que significa que algumas das amostras permitiam a identificação de mais de um vírus pesquisado.

Após a eletroforese e ao visualizar os géis e foi possível identificar os vírus de acordo com os tamanhos das bandas obtidas (Figura 8 e 9). Para o a banda HSV1 a banda é de 271 pb, HSV2 é de 231 pb, para o EBV de 326 pb e para CMV de 368 pb.

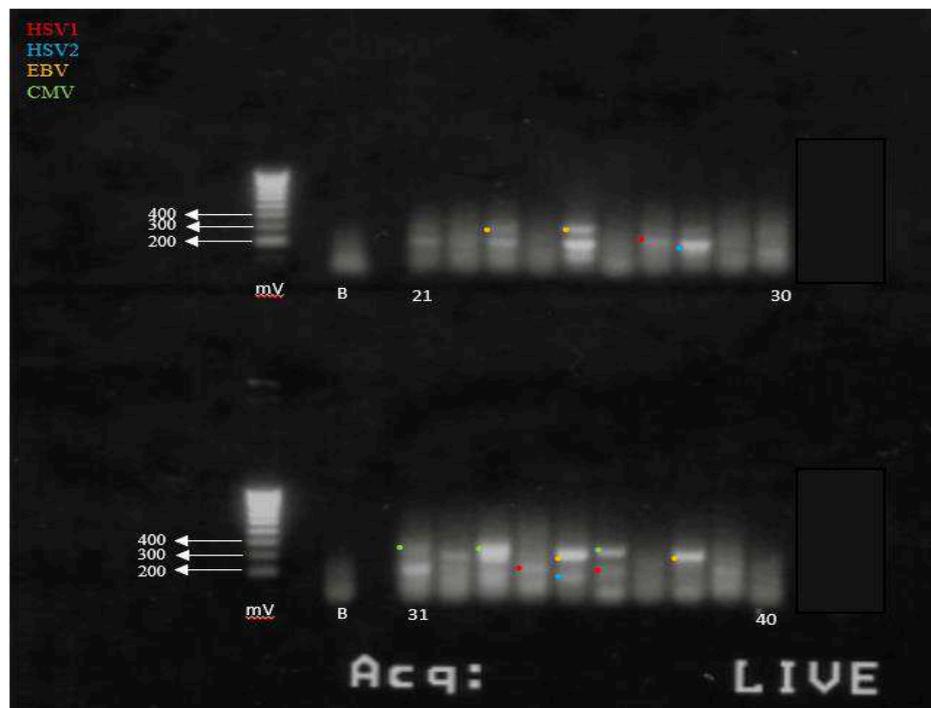


Figura 8: Resultados dos testes de PCR relativos à pesquisa de vírus HSV-1 (vermelho), HSV-2 (azul), EBV (amarelo) e CMV (verde) para as amostras (21-40) correspondentes a doentes periodontais. As marcações presentes procuram demonstrar como foram identificados os vírus. O marcador indicado é o V (mV) onde se destacam das bandas de 200pb, 300 pb e 400 pb. Imediatamente após este temos um poço com o teste branco (B).

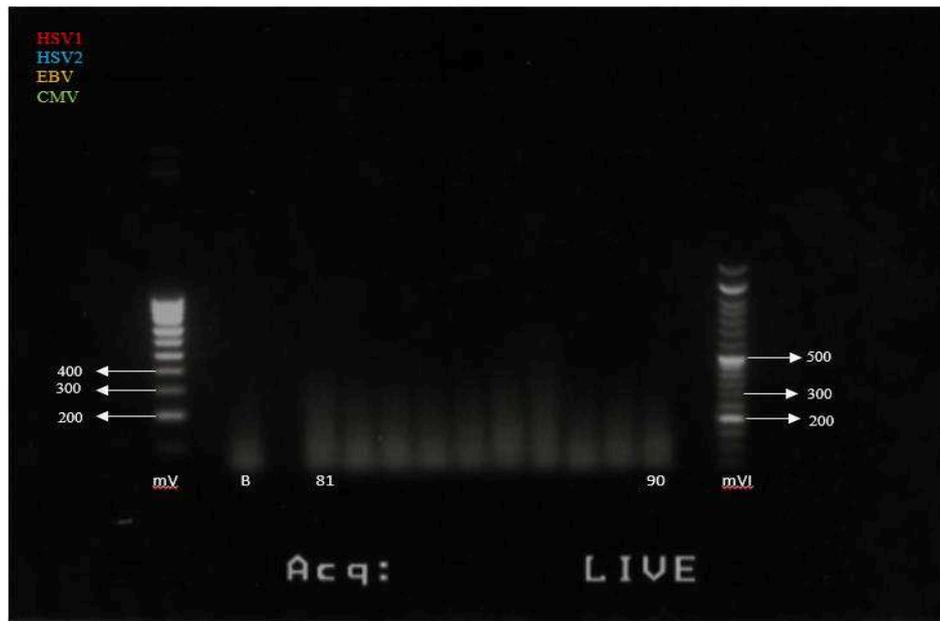


Figura 9: Resultados de PCR para 10 indivíduos do grupo com periodonto saudável (81-90). Estão representados 2 marcadores o V (mV) e o VI (mVI).

III.2.1 Presença de vírus Herpes Simples 1

Comparando os dois grupos relativamente à presença de Herpes Simples 1, no grupo de indivíduos saudáveis apenas foi detetado o vírus numa amostra (2% dos indivíduos), enquanto no grupo com doença periodontal, em 19 indivíduos foi detetado Herpes Simples 1 (38%) (Gráfico 9).

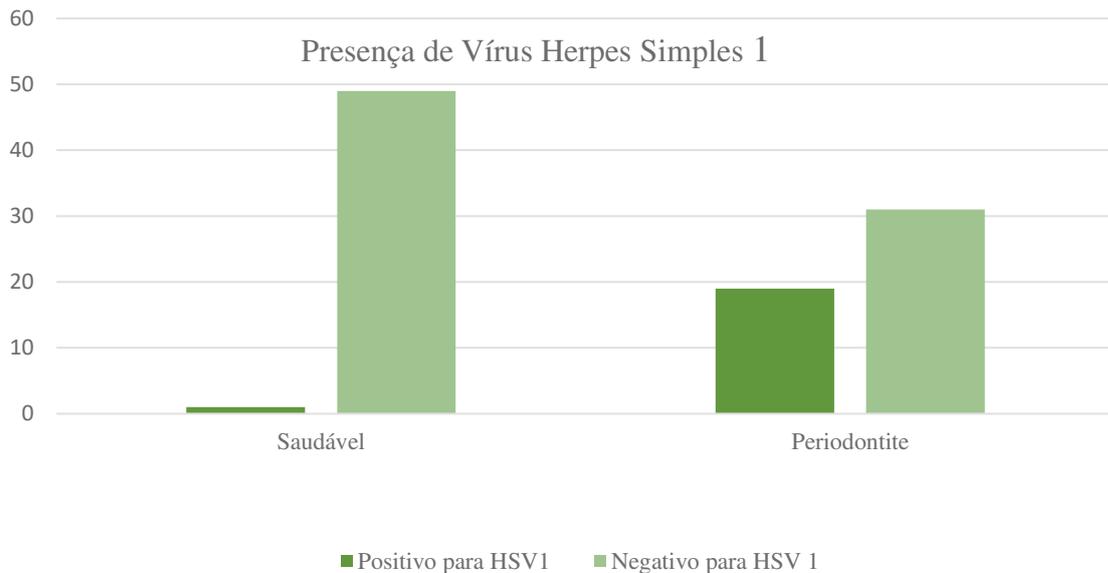


Gráfico 9: Proporções virais de HSV-1 encontradas no grupo saudável e no grupo de doentes periodontais. A verde escuro representa-se o número de amostras que contêm HSV-1 e a verde claro as amostras onde este não estava presente, para cada grupo de estudo (n=50 para ambos os grupos).

Realizou-se uma análise estatística inferencial, onde se concluiu que para este vírus, existe associação entre a presença do vírus e a doença periodontal ($p \leq 0,001$, teste do Qui-Quadrado).

III.2.2 Presença de vírus Herpes Simples 2

Relativamente ao vírus Herpes Simples 2, foi detetado em apenas um indivíduo do grupo saudável (2%) e em 12 indivíduos do grupo com periodontite (24%) (Gráfico 10).

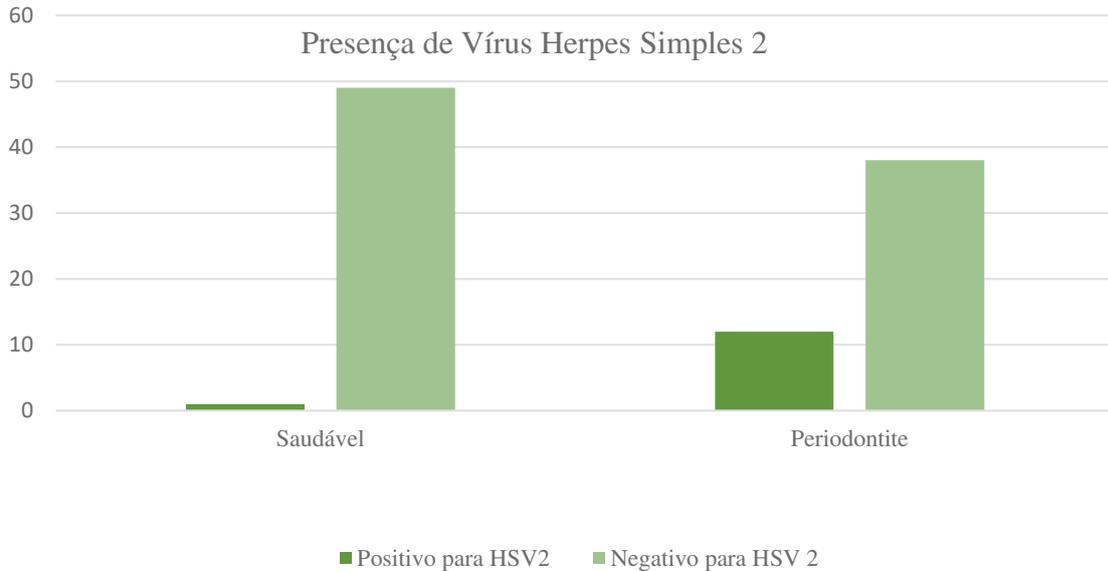


Gráfico 10: Proporções virais de HSV-2 encontradas no grupo saudável e no grupo de doentes periodontais. A verde escuro representa-se o número de amostras que contêm HSV-2 e a verde claro as amostras onde este não estava presente, para cada grupo de estudo (n=50 para ambos os grupos).

Realizou-se uma análise estatística inferencial, onde se concluiu que para HSV-2, existe associação entre a presença do vírus e a doença periodontal ($p=0,001$, teste do Qui-Quadrado).

III.2.3 Presença de vírus Epstein-Barr

O vírus Epstein-Barr foi detetado em 1 amostra do grupo saudável e em 16 amostras do grupo de doentes periodontais (32%) (Gráfico 11).

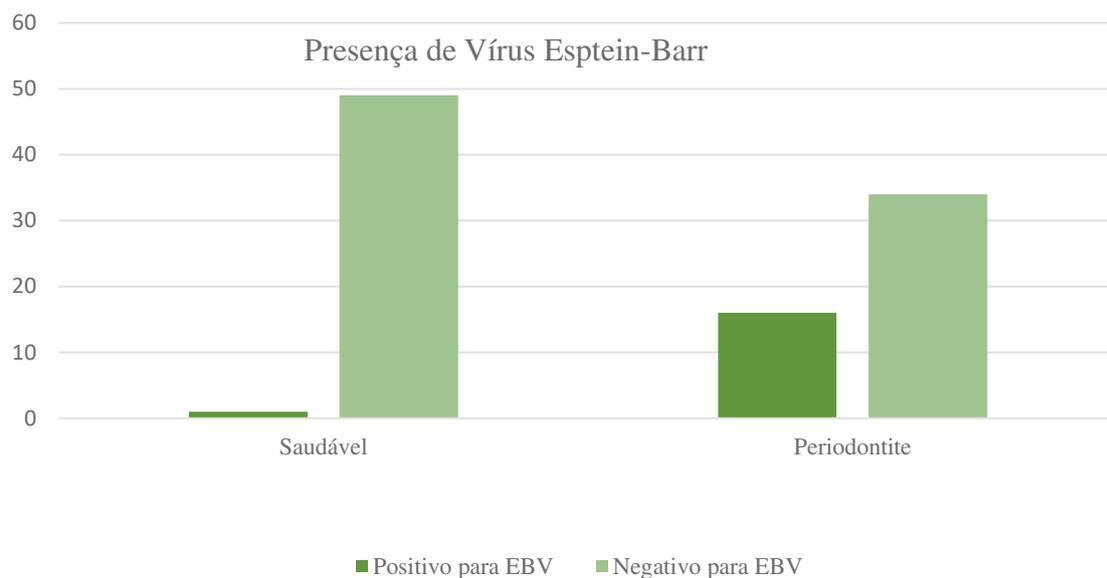


Gráfico 11: Proporções virais de EBV encontradas no grupo saudável e no grupo de doentes periodontais. A verde escuro representa-se o número de amostras que contêm EBV e a verde claro as amostras onde este não estava presente, para cada grupo de estudo (n=50 para ambos os grupos).

Perante a análise estatística inferencial, concluiu-se que para EBV, existe associação entre a presença do vírus e a doença periodontal ($p \leq 0,001$ perante o teste do Qui-Quadrado).

III.2.4 Presença de vírus Citomegalovírus

Por fim, relativamente ao vírus Citomegalovírus, este não foi detetado em nenhuma das amostras do grupo saudável, no entanto identificou-se em 6 amostras do grupo de doentes periodontais (12%) (Gráfico 12).

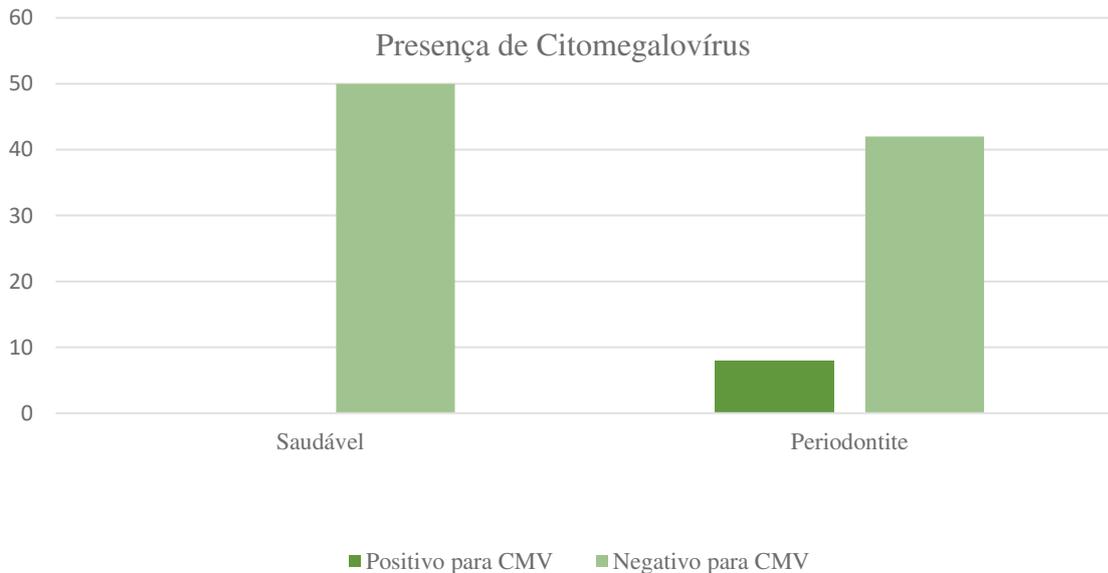


Gráfico 12: Proporções virais de CMV encontradas no grupo saudável e no grupo de doentes periodontais. A verde escuro representa-se o número de amostras que contêm CMV e a verde claro as amostras onde este não estava presente (n=50 para ambos os grupos).

Como no grupo dos doentes saudáveis não foi encontrado nenhum vírus, o teste do Qui quadrado não pode ser utilizado.

III.3 Avaliação da associação entre a presença de vírus e as variáveis utilizadas para caracterizar a amostra

No questionário aplicado, foram recolhidos dados acerca do sexo, idade, hábitos tabágicos, hábitos alcoólicos, de higiene oral e presença de patologia diabética.

Correlacionaram-se os dados recolhidos com os resultados obtidos na pesquisa viral nos doentes com patologia periodontal.

a. Relação com a idade

Verificou-se que não existe associação entre a idade e a presença de vírus pesquisados (Tabela 7).

Tabela 7: Valores de p ($>0,05$) obtidos pelo teste Qui-Quadrado ao averiguar a associação entre as variáveis "vírus" e "idade do doente periodontal".

Vírus	Valor de p
HSV 1	0,483
HSV2	0,679
EBV	0,854
CMV	0,257

b. Relação com o sexo do participante

Também se verifica que não existe associação entre o sexo e a presença de vírus (Tabela 8).

Tabela 8: Valores de p ($>0,05$) obtidos pelo teste Qui-Quadrado ao averiguar a associação entre as variáveis "vírus" e "género do doente periodontal".

Vírus	Valor de p
HSV 1	0,425
HSV2	0,393
EBV	0,981
CMV	0,575

c. Relação com hábitos alcoólicos

Para esta variável não foi novamente encontrada associação com a presença de HSV1, HSV2 e EBV.

No caso do vírus CMV as amostras não se demonstraram suficientes para retirar conclusões (Tabela 9.).

Tabela 9: Valores de p (>0,05) obtidos pelo teste Qui-Quadrado ao averiguar a associação entre as variáveis "vírus" e "hábitos alcoólicos".

Vírus	Valor de <i>p</i>
HSV 1	0,464
HSV2	0,764
EBV	0,566
CMV	----

d. Relação com hábitos tabágicos, higiene oral e Diabetes

Relativamente a estes fatores não foi possível retirar resultados de nenhuma associação entre os mesmos e a presença de vírus em doentes periodontais, porque ao existirem muitas opções de escolha por cada variável e uma amostra reduzida não se podem tirar resultados conclusivos de associação ou a sua ausência.

Quanto à diabetes, apenas 1 dos indivíduos apresentava a patologia não tendo sido encontrada qualquer associação aos vírus pesquisados.

IV. Discussão de resultados

A presente investigação procura comparar a presença de quatro vírus, Herpes Simples 1 (HSV1), Herpes Simples 2 (HSV2), Epstein-Barr (EBV) e Citomegalovírus (CMV) em bolsas periodontais, entre indivíduos e indivíduos saudáveis.

Utilizou-se o teste PCR Multiplex, para detetar os respetivos vírus, um teste específico e sensível para a deteção de vírus de importância epidemiológica e clínica (Templeton et al., 2004).

Perante os resultados obtidos e comparando os dois grupos estudados, torna-se evidente a diferença significativa encontrada na proporção viral, entre indivíduos saudáveis e com doença periodontal.

Apenas para o CMV não foi possível avaliar estatisticamente a diferença na distribuição entre os dois grupos, no entanto é evidente a diferença entre os mesmos. Não foi encontrado este vírus no grupo saudável e estava presente em 12% dos indivíduos com doença periodontal.

Não foi encontrada associação entre a presença ou não de vírus e as variáveis sexo e faixa etária do indivíduo, como também se verificou no estudo conduzido em 2015 por Mohammad Kazi e colaboradores.

A doença periodontal é uma doença crónica comum. Diferentes bactérias são-lhe associadas e descritas como implicadas na sua patogénese. No sulco gengival foram identificadas mais de 400 bactérias diferentes, no entanto apenas menos de 20 espécies são consideradas periodontopatogénicas (Slots, 2004).

A Periodontite é uma infeção do periodonto, o seu curso natural é geralmente marcado por períodos de remissão, que são interrompidos por períodos de relapso clínico, cuja origem biológica não se encontra claramente explicada. A virulência dos microrganismos infecciosos demonstra-se altamente determinante na progressão da doença, no entanto, foram também sugeridos fatores ambientais, imunitários, demográficos e virais. Com a avaliação da forma como a doença progride os vírus começaram a ser objeto de estudo neste campo (Ambili et al., 2013).

Atualmente, perante inúmeras investigações no ramo da Periodontologia, é razoável assumir que os vírus têm influência na etiopatogenia da doença periodontal. Em alguns trabalhos de pesquisa e ao avaliar doentes periodontais demonstrou-se que a

população viral em algumas localizações dentárias chega a ser equivalente à contagem bacteriana no mesmo local (Slots, 2010).

Investigações neste campo podem vir a revolucionar estratégias de diagnóstico e tratamento da doença (Ambili et al., 2013).

Apesar do vasto universo de vírus conhecido, apenas cerca de 40 têm importância médica. Quando à doença periodontal existem vírus, da família *Herpesviridae*, que têm sido regularmente identificados em peças dentárias afetadas pela doença (Saygun, Kubar, Sahin, Sener & Slots, 2008)

Da família *Herpesviridae* existem 8 vírus que estão regularmente associados a doenças do corpo humano, destes destacam-se Herpes Simples 1, Herpes Simples 2, Herpes Simples 6 e 8, Epstein-Barr e Citomegalovírus, (Contreras, Nowzari & Slots, 2000). Os vírus mais pesquisados na área da periodontologia são HSV-1 e 2, EBV e CMV (Zaveri et al., 2016).

Os vírus que a presente investigação trata têm sido encontrados em diversos estudos, quer em amostras de tecido gengival, fluído crevicular, saliva como em placa subgengival (Ambili et al., 2013).

Contreras e colaboradores em 2000 afirmaram que a gengiva pode funcionar como um reservatório para estes vírus, num estudo onde identificaram Epstein-Barr em 79% das amostras e Citomegalovírus em e 43% das amostras de tecido gengival de indivíduos periodontalmente comprometidos. No entanto, este estudo utilizou uma amostra pequena de 25 participantes, o que pode ter condicionado a relação das variáveis que não se demonstrou estatisticamente significativa. Em 2004, Kubar encontrou uma quantidade notável destes vírus também em amostras de tecido gengival. Num estudo mais recente, feito em 2013 foi encontrada uma percentagem significativa de células infetadas por EBV no tecido gengival de doentes periodontais (Kato et al. 2013).

Achados de EBV e HSV 1 em percentagens que variam entre 76% a 80% em doentes com periodontite, contrastam drasticamente com os 12% encontrados em pacientes saudáveis (Das et al. 2012).

Em 2004, num estudo conduzido por Saygun foram identificados CMV, EBV e HSV1 em 75% dos locais pesquisados em pacientes periodontais, o que contrastava com a ausência destes vírus em pacientes saudáveis e levou o autor a inferir que estes estejam

relacionados com a etiopatogenia da doença. Foi no mesmo ano que outra pesquisa, voltou a encontrar diferenças significativas entre a presença de vírus em doentes periodontais e a ausência dos mesmo em indivíduos saudáveis (Kubar et al., 2004).

Em estudos feitos no fluido crevicular de pacientes periodontais, encontrou-se a prevalência de 43% de EBV e 3% de CMV, não tendo encontrado vírus em participantes saudáveis (Klemenc et al., 2005).

Em 2009, num estudo do mesmo género, foi encontrada uma percentagem destes vírus (HSV, EBV e CMV) de 45% em pacientes periodontais que por sua vez se mostraram muito diferentes quando comparado com o grupo controlo de participantes sãos.

A doença periodontal pode apresentar-se de diferentes formas e a identificação de vírus varia também consoante o tipo de lesão periodontal em questão, o local de colheita da amostra, tratamento periodontal prévio, o estado imunitário do sujeito, o método laboratorial empregue para a sua identificação. A área geográfica e etnia são fatores também relevantes. Falsos negativos e positivos podem ocorrer por variação destes fatores no entanto, a evidência da presença de vírus é ampla em diversas formas de doença periodontal (Ambili et al., 2013).

Perante quadros de gengivite, foram encontradas percentagens de 20% de EBV e 33% de CMV. No entanto, perante uma infeção gengival e indivíduos saudáveis estes vírus apresentam-se em estados não transcripcionais (Rotola et al., 2008).

Perante quadros de periodontite encontra-se uma variação ampla da ocorrência de vírus, onde HSV se encontra presente em 3-100% dos locais pesquisado, EBV entre 3-89% e CMV entre 0,3-83% (Ambili et al., 2013). Na periodontite crónica estes são os vírus que mais se identificam na maioria das regiões afetadas pela doença (Hochman, Zakay-Rones & Shohat et al., 1998).

Os resultados obtidos neste trabalho de investigação encontram-se entre as percentagens publicadas por Ambili e colaboradores em 2013, uma vez que se detetou HSV 1 em 38% dos doentes com periodontite, HSV 2 em 24%, EBV em 32% e CMV em 12%.

Também nos abscessos periodontais, periodontite necrotizante e periodontite induzida por HIV há identificação de vírus. Nos abscessos periodontais detetou-se Vírus Epstein-Barr e Citomegalovírus em percentagens de 72% e 67% respetivamente, não tendo estes sido encontrados após tratamento ou mesmo em indivíduos saudáveis (Saygun et al. 2004).

Em indivíduos infetados pelo vírus HIV, HSV1, HSV2, EBV e CMV sofrem reativação facilmente, o que consecutivamente irá causar danos teciduais que acabam por causar destruição periodontal (Cobb, 2003).

Slots em 2010 agrupou diversos estudos feitos na área da Periodontologia, onde se pesquisou HSV 1, HSV 2, EBV e CMV.

No que respeita, o vírus HSV 1, estudo semelhantes encontraram percentagens de 13% (Grenier et al., 2009), de 100% (Bilichodmath et al., 2009), 40% (Imbronito et al., 2008), 16% (Grande et al., 2008), 26% (Nishiyama et al., 2008), 31% (Ling et al., 2004) e 21% (Contreras et al., 2000). Destas investigações extrai-se uma média de aparecimento deste vírus de 26% (Slots, 2010). Em 2015, no estudo de Mohammad Kazi e colaboradores, para o vírus HSV 1 a percentagem identificada foi de 28% num grupo de indivíduos com doença periodontal e em 2017 de 50% (Muzammil, Jayanthi, Faizuddin, & Ahamadi, 2017).

As percentagens virais, obtidas nos estudos acima, são compatíveis e próximas das obtidas na presente investigação, onde 38% das amostras analisadas evidenciavam a presença de DNA viral correspondente a HSV1. Este valor apresenta-se acima da média indicada no relatório feito por Slots em 2010.

Quanto ao HSV 2 a investigação de Bilichodmath e colaboradores, em 2009, identificou 16% de pacientes com doença periodontal com a presença deste vírus. Em 2015, no estudo de Mohammad Kazi e colaboradores, identificou-se 32% de DNA viral para o vírus em questão. Mais recentemente em 2018 Chatzopoulou e colaboradores encontraram uma percentagem de 12,8% para o HSV 2 ao investigar a presença de vírus num grupo com periodontite.

No presente estudo, o vírus HSV 2 foi identificado em 24% das amostras de indivíduos com doença periodontal analisadas, o que é compatível com os estudos

enunciados acima, sendo uma percentagem que se ajusta entre os valores descritos e se aproxima bastante do valor obtido por Muzammil e colaboradores em 2017, de 26,7 %.

No entanto, existem ainda estudos onde não se detetou a presença deste vírus ou os valores não se apresentaram significativos como os de Sushma et al. em 2012 ou Slots e Contreras em 2001.

Uma das hipóteses que Slots e Contreras apresentaram em 2001 para este facto, prende-se com a influência que HSV 1 tem sobre HSV 2, o primeiro encurta a duração dos sintomas do segundo e diminui a severidade das primoinfeções por este vírus. Desta forma os autores especularam que seria possível que quem contrai HSV 1 precocemente na vida, ganhe algum tipo de imunidade para HSV 2.

Para o vírus Epstein-Barr a presente investigação, obteve uma percentagem de 32% de amostras positivas para este vírus no grupo com periodontite, o que contrastou com os achados no grupo saudável.

O valor obtido neste trabalho, encontra-se em concordância com o intervalo de valores enunciados por Ambili e colaboradores em 2013 que detetou este vírus entre 3-89% dos casos. Existem outros estudos que nos demonstram que o EBV é comumente encontrado em indivíduos que sofrem de doença periodontal, quer em amostras de tecido gengival, como em fluído crevicular e placa subgengival (Zaveri et al., 2016).

Aggarwal e colaboradores, em 2017 relataram que a média para os achados deste vírus em doentes periodontais é de 46%, valor este que se encontra acima da percentagem encontrada na presente investigação.

Avaliando o relatório de Slots em 2010, existem inúmeras investigações para a pesquisa destes vírus em pacientes periodontais com patologia crónica, onde as percentagens variam bastante: 28% (Dawson et al., 2009), 3% (Grenier et al., 2009), 47% (Imbronito et al., 2008), 79% (Chalabi et al., 2008), 40% (Sunde et al., 2008), 38% (Wu et al., 2007), 23% (Li et al., 2004), 44% (Klemenc et al., 2005) entre outros estudos.

Em 2015 Mohammad Kazi e colaboradores apontaram percentagens de 30,66% para o vírus Epstein-Barr, resultado esse que é próximo do obtido na corrente investigação.

Das e colaboradores em 2012 para a pesquisa de EBV em pacientes com periodontite crónica encontraram a mesma percentagem que no presente estudo (32%),

valor esse que é também obtido por Slots em 2015 ao fazer a percentagem média de detecção de vírus Epstein-Barr em estudos para periodontite crônica: 32%.

Relativamente a Citomegalovírus a percentagem obtida neste estudo foi de 12% para doentes periodontais e de 0% para indivíduos saudáveis.

Agrawal e colaboradores em 2017 perante um estudo em indivíduos periodontalmente comprometidos encontraram uma percentagem idêntica de 13,33% para o CMV. Neste estudo procurava-se avaliar o local de colheita da amostra – se mais a apical da bolsa ou mais a cervical – tinha influência na percentagem viral.

Em 2010 Slots agrupou as investigações que pesquisavam vírus em doentes periodontais e chegou a uma média de 52% o que se encontra consideravelmente acima do valor encontrado no presente estudo.

Dos estudos descritos por Slots, em 2010, encontram-se percentagens de 0,3% (Dawson et al., 2009), 26% (Bilichodmath et al., 2009), 80% (Grande et al., 2008), 83% (Imbronito et al. 2008) 12% (Sunde et al., 2008), 3% (Klemenc et al., 2005) e 27% (Kubar et al., 2005).

Perante todos os estudos realizados neste campo, a conclusão assente, de que os vírus são um elemento importante na doença periodontal, muda o conceito da patogenia e imunologia da doença (Slots, 2010).

O vírus HSV-1, CMV e EBV têm sido associados a bactérias periodontopatogénicas como *P. gingivalis*, *Aggregatibacter*, *Treponema denticola*, *P. intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Tannerella forsythia* (Slots, 2000). Alguns estudos correlacionam ainda a ação conjunta de bactérias e vírus. Os vírus CMV e EBV reduzem a resposta fagocítica de células do sistema imune do hospedeiro, o que resulta no crescimento bacteriano local (Lin & Li, 2012) O vírus CMV e EBV demonstraram forte associação com a *P. gingivalis* e a *Tannerella forsythia*, duas espécies bacterianas de peso para a doença periodontal (Saygun et al. 2008). Ainda relativamente ao EBV, um estudo demonstrou que se este vírus está presente, há 9,3 vezes mais chance de encontrar *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Michalowicz, 2000)

O crescimento bacteriano local pode estar relacionado com a libertação de citocinas pro inflamatórias mediadas por estes vírus, que suprimem citocinas anti-

inflamatórias do hospedeiro, diminuindo a produção de anticorpos contra bactérias periodontopatogénicas (Slots, 2015).

Por outro lado, outros estudos comprovam que as bactérias periodontopatogénicas podem também promover a infeção viral através de enzimas bacterianas que reativam infeções por vírus deste tipo. Um bom exemplo é a *Porphyromonas gingivalis* que atua na reativação do vírus EBV potenciando a disseminação da infeção viral, e bilateralmente a reativação deste vírus pode potenciar o crescimento de bactérias desta espécie (Sugano, 2004). Num estudo feito em 2015, os autores chegaram à conclusão que HSV1, HSV2, EBV e CMV estão associados com a doença periodontal, mais especificamente com estados mais severos da mesma (Kazi, Bharadwaj, Bhat, Happy, 2015).

Perante as percentagens de vírus detetadas no presente estudo e em estudos semelhantes, assim como o mecanismo biológico associado a uma infeção viral leva a pensar que em alguns casos de periodontite os vírus podem representar um papel fundamental na progressão da doença. Desta forma, e como cada paciente é um caso distinto, seria importante saber se a periodontite é ou não causada por reativação viral, sendo que com este conhecimento se poderia atuar no cerne da questão de outra forma, ou seja atuar no controlo de Herpesvirus e placa subgingival. O tratamento antiviral pode assistir neste fato, não dispensando o tratamento periodontal (alisamento radicular ou cirurgia), questão que tem sido estudada recorrendo a estudos onde se utilizam estes fármacos no tratamento da periodontite (Sunde et al., 2008).

O valaciclovir é um fármaco antiviral de administração oral que inibe a DNA polimerase de vírus da família *Hesperiviridae* e consecutivamente a sua replicação. É particularmente eficaz contra HSV 1 e EBV (Patel, 1997).

Em 2014 Fu e colaboradores, fizeram um ensaio clínico em 59 pacientes com periodontite crónica avançada onde o tratamento foi efetuado recorrendo a alisamento radicular e destartarização, tendo sido receitado também valaciclovir (1 semana) a um dos grupos, enquanto o outro recebeu apenas um placebo. Os resultados do estudo realçam um *outcome* significativamente positivo pela utilização de valaciclovir.

A doença periodontal ativa pode estar associada a reativações virais de vírus específicos, bactérias periodontopatogénicas e reações imunológicas desreguladas. Desta forma, um tratamento periodontal que não tenha como alvo a etiologia específica da infeção resultará em melhorias clínicas não evidentes. Os vírus podem permanecer nos

tecidos periodontais por longos períodos de tempo, o que pode representar um risco para a progressão da doença (Slots & Slots, 2019).

Investigações neste campo podem vir a revolucionar estratégias de diagnóstico e tratamento da Periodontite (Ambili et al., 2013).

V. Conclusão

O presente estudo tinha como objetivo investigar a presença de vírus bolsas periodontais em doentes com periodontite e comparar esses achados com um grupo de pacientes saudáveis. Havia duas hipóteses possíveis: H_0 (as variáveis *vírus* e *doença periodontal* não estão associadas) ou H_1 (as variáveis *vírus* e *doença periodontal* estão associadas).

As percentagens de vírus detetadas em doentes periodontais (n=50) contrastou com os vírus encontrados em pacientes com periodonto saudável (n=50), tendo sido encontrada associação entre as variáveis: *vírus* (HSV1, HSV2 e EBV) e *doença periodontal*. O mesmo não foi possível para o vírus CMV uma vez que como nenhum exemplar foi encontrado no grupo de indivíduos saudáveis, não se podendo avaliar a sua associação com a patologia. Os vírus HSV1, HSV2, EBV e CMV foram detetados em 38%, 24%, 32% e 12% das amostras em indivíduos com periodontite.

A presente investigação, assim como inúmeros estudos realizados neste âmbito, permitem concluir que a diferença na presença de vírus entre doentes periodontais e indivíduos saudáveis é relevante e deve ser tida em consideração. Indica ainda que os mesmos vírus podem ter um papel na doença periodontal.

Aquando da colheita, era benéfico aumentar os 30 segundos em objetivo de absorver mais quantidade de amostra. A técnica utilizada para identificação de vírus, foi o teste PCR Multiplex, que apesar de apresentar diversas vantagens associadas pode apresentar uma sensibilidade reduzida na deteção de microrganismos, o que pode ter gerado falsos negativos.

O grupo de pacientes periodontais totalizava 50 participantes não tendo sido encontrada associação entre a as variáveis *vírus* e *idade/sexo/hábitos alcoólicos*. No entanto, para outras variáveis estudadas pelo mesmo questionário não foi possível averiguar associação, entre elas e vírus pesquisados. Este facto, prende-se com as várias opções de resposta que evidenciam 50 participantes como uma população pequena para extrair conclusões da associação entre vírus e essas variáveis estudadas.

Perante a hipótese atualmente mais aceite de que as bactérias são imperativas ao desenvolvimento da patologia periodontal, verifica-se, no entanto, que por vezes não são suficientes para explicar a destruição tecidual existente ou mesmo as reativações

exacerbadas da mesma. Os vírus Herpes não são a etiologia primordial da patologia periodontal, mas devem ser vistos como um fator de risco, pelas alterações provocadas no sistema imune do hospedeiro. A infecção viral provoca a produção e secreção de citocinas proinflamatórias com potencial ativador de osteoclastos e MMPs levando a destruição tecidual local. Os vírus devem ser vistos como um fator de risco para a reativação da doença e sua severidade. Desta forma, quando presentes, podem ter um papel putativo na doença e atuar na reativação da mesma, pois para além de possibilitarem um aumento do número de bactérias periodontopatogénicas por comprometimento do sistema imune, estas podem ainda participar na reativação viral via alguns metabolitos. Esta infecção mediada por vírus e bactérias resulta numa maior destruição dos tecidos periodontais.

O diagnóstico cuidado em Periodontologia, como em qualquer outra patologia, é um passo importantíssimo para o tratamento correto e um prognóstico satisfatório. Desta forma, seria importante a utilização de testes serológicos para a pesquisa destes vírus em casos onde a doença periodontal seja mais severa e demonstre reativações recorrentes ao longo do tempo, para se poder adotar uma terapêutica mais direcionada para um dos fatores de risco presentes. Através do teste serológico, caso se confirme a presença de HSV1, HSV2, EBV e/ou CMV a utilização de um fármaco antiviral pode ser um meio de alcançar resultados mais satisfatórios após terapêutica periodontal convencional. A deteção da presença de vírus não elimina a necessidade de tratamento clínico ou cirúrgico, mas serve para eliminação de um dos fatores de risco presentes, de forma satisfatória.

Perante um episódio de infecção respiratória, é importante saber se o agente causador é bacteriano ou viral, para saber que meios terapêuticos abordar. No caso da periodontite as bactérias estão sempre presentes, mas podem existir vírus a contribuir para uma infecção mais abrupta com destruição tecidual mais severa, sendo necessário agir sobre estes agentes para eventualmente melhorar o prognóstico.

VI. Referências Bibliográficas

- Agrawal, C., Pudakalakatti, P., Shah, M. P., Bhat, K. G., Pati, S., & Gupta, S. (2017). *Detection and Assessment of Human Cytomegalovirus, Epstein-Barr Virus.*
- Al-Ghamdi HS. and Anil S. (2007). *Serum antibody levels in smoker and non-smoker saudi subjects with chronic periodontitis. Journal of periodontology, 78(6), 1043- 50.*
- Ambili, R., Preeja, C., Archana, V., Nisha, K. J., Seba, A., & Reejamol, M. K. (2013). *Viruses: are they really culprits for periodontal disease? A critical review. Journal of investigative and clinical dentistry, 5(3), 179-187.*
- American Academy of Periodontology. (2000). *Parameter on systemic conditions affected by periodontal diseases. American Academy of Periodontology, Journal of periodontology, 71(5), 880-883.*
- Armitage, G. (1999). *Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. Ann Periodontol; 4: 1-6.*
- Armitage, G. (2000). *Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. Periodontology. 2004; 34:9–21.*
- Armitage, G. C. (2004). *Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. Periodontology 2000, 34(1), 9-21.*
- Barros, S. P., Williams, R., Offenbacher, S., & Morelli, T. (2016). *Gingival crevicular fluid as a source of biomarkers for periodontitis. Periodontology 2000, 70(1), 53-64.*
- Bascones Martínez A. and Figuero Ruiz E. (2005). *Las enfermedades periodontales como infecciones bacterianas. Av Periodon Implantol, 17(3), 147-*
- Bilichodmath, S., Mangalekar, S. B., Sharma, D. C., Prabhakar, A. K., Reddy, S. B., Kalburgi, N. B., ... & Bhat, K. (2009). *Herpesviruses in chronic and aggressive periodontitis patients in an Indian population. Journal of Oral Science, 51(1), 79-86.*
- Blakeslee Jr, J. R. (2019). *MEDICAL VIROLOGY. Comparative Pathobiology of Viral Diseases, 1, 23.*
- Bosshardt, D. D., & Selvig, K. A. (1997). *Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. Periodontology 2000, 13(1), 41-75.*

- Botero, J.E., Vidal, C., Contreras A., Parra, B. (2008). Comparison of nested polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR and viral culture for the detection of cytomegalovirus in subgingival samples. *Oral Microbiol Immunol*; 23(3):239–44.
- Botero, J. E., Contreras, A., & Parra, B. (2008). Effects of cytomegalovirus infection on the mRNA expression of collagens and matrix metalloproteinases in gingival fibroblasts. *Journal of periodontal research*, 43(6), 649-657.
- Cappuyns, I., Gugerli, P., & Mombelli, A. (2005). Viruses in periodontal disease—a review. *Oral diseases*, 11(4), 219-229.
- Caton, J. G., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I. L., Jepsen, S., Kornman, K. S., ... & Tonetti, M. S. (2018). A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions—Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of periodontology*, 89, S1-S8.
- Chalabi, M., Rezaie, F., Moghim, S., Mogharehabed, A., Rezaei, M., & Mehraban, B. (2010). Periodontopathic bacteria and herpesviruses in chronic periodontitis. *Molecular oral microbiology*, 25(3), 236-240.
- Chalabi, M., Moghim, S., Mogharehabed, A., Najafi, F., & Rezaie, F. (2008). EBV and CMV in chronic periodontitis: a prevalence study. *Archives of virology*, 153(10), 1917.
- Chapple, I. L., Mealey, B. L., Van Dyke, T. E., Bartold, P. M., Dommisch, H., Eickholz, P., ... & Griffin, T. J. (2018). Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of periodontology*, 89, S74-S84
- Chapurlat, R. D., & Confavreux, C. B. (2016). Novel biological markers of bone: from bone metabolism to bone physiology. *Rheumatology*, 55(10), 1714-1725.
- Chatzopoulou, E., Fanourakis, G., Trianti, M., & Dereka, X. (2018). Herpes Simplex Virus 1 and 2 in Chronic Periodontitis: Prevalence and Association with Clinical Parameters. *Dent. Health Curr Res*, 4, 2.
- Chavez-Verau. and Alarcón-Palacios. (2012). Enfermedad gingival en adolescentes, diagnóstico y tratamiento. *Rev Estomatol Herediana*, 22(3), 167-70.

- Christenson, R. H. (1997). *Biochemical markers of bone metabolism: an overview. Clinical biochemistry*, 30(8), 573-593.
- Cobb, C. M., Ferguson, B. L., Keselyak, N. T., Holt, L. A., MacNeill, S. R., & Rapley, J. W. (2003). *A TEM/SEM study of the microbial plaque overlying the necrotic gingival papillae of HIV-seropositive, necrotizing ulcerative periodontitis. Journal of periodontal research*, 38(2), 147-155.
- Cohen, J. I. (2000). *Epstein–Barr virus infection. New England Journal of Medicine*, 343(7), 481-492
- Contreras, A., Botero, J. E., & Slots, J. (2014). *Biology and pathogenesis of cytomegalovirus in periodontal disease. Periodontology 2000*, 64(1), 40-56.
- Creanor, S. (2016). *Essential clinical oral biology* (p. 73).
- Darveau RP: *Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis, Nat Rev Microbiol* 8:481–490, 2010.
- Das, M. K., & Chakraborty, T. (2018). *Molecular diagnosis of CNS viral infections. In The Microbiology of Central Nervous System Infections* (pp. 45-59).
- Drisko, C. H. (2001). *Nonsurgical periodontal therapy. Periodontology 2000*, 25(1), 77-88.
- Ebersole, J. L., Dawson III, D. R., Morford, L. A., Peyyala, R., Miller, C. S., & González, O. A. (2013). *Periodontal disease immunology: ‘double indemnity’ in protecting the host. Periodontology 2000*, 62(1), 163-202.
- Escalona, L. A., & Limonchy, M. E. (2009). *Asociación de virus epstein barr con la enfermedad periodontal. Acta Odontológica Venezolana*, 47(3).
- Escudero-Castaño N, Perea-García MA and Bascones-Martínez A. (2008). *Revisión de la periodontitis crónica: Evolución y su aplicación clínica. Av Periodon Implantol*, 20 (1), 27-37.
- Faria-Almeida R., López-Alba A., Rodríguez-Casanova HJ. and Herrera D. (2013). *Efecto de las enfermedades periodontales sobre la diabetes. Periodoncia y Osteointegración*, 23, 109-116.
- Garlet, G. P., Aranha, A. M., Silveira, E. M., Vieira, A. E., Queiroz-Junior, C. M., Madeira, M. F., ... & Silva, T. A. (2012). *The role of chemokines and cytokines in the*

- pathogenesis of periodontal and periapical lesions: Current concepts. In Inflammation, Chronic Diseases and Cancer-Cell and Molecular Biology, Immunology and Clinical Bases.*
- Gámez, S. S., Ruiz, M. P., & Marí, J. M. N. (2014). *Infección por citomegalovirus humano. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 32, 15-22.*
- Greenwell H. (2001). *Guidelines for periodontal therapy. J Periodontol, 72(11), 1624–8.*
- Grenier, G., Gagnon, G., & Grenier, D. (2009). *Detection of herpetic viruses in gingival crevicular fluid of patients suffering from periodontal diseases: prevalence and effect of treatment. Oral microbiology and immunology, 24(6), 506-509.*
- Gupta, G. (2013). *Gingival crevicular fluid as a periodontal diagnostic indicator-II: Inflammatory mediators, host-response modifiers and chair side diagnostic aids. Journal of medicine and life, 6(1), 7.*
- Haber, J., Wattles, J., Crowley, M., Mandell, R., Joshipura, K., & Kent, R. L. (1993). *Evidence for cigarette smoking as a major risk factor for periodontitis. Journal of periodontology, 64(1), 16-23.*
- Haffajee AD. and Socransky SS. (2001). *Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. Journal of clinical periodontology, 28(5), 377-88.*
- Heredia, A., Soriano, V., Weiss, S. H., Bravo, R., Vallejo, A., Denny, T. N., ... & Hewlett, I. K. (1996). *Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection and discrimination of HIV-1, HIV-2, HTLV-I and HTLV-II. Clinical and diagnostic virology, 7(2), 85-92.*
- Hajishengallis, G. (2015). *Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. Nature Reviews Immunology, 15(1), 30.*
- Hienz, S. A., Paliwal, S., & Ivanovski, S. (2015). *Mechanisms of bone resorption in periodontitis. Journal of immunology research, 2015*
- Hochman, N., Zakay-Rones, Z., Shohat, H., Ever-Hadani, P., Ehrlich, J., Schlesinger, M., & Morag, A. (1998). *Antibodies to cytomegalo and Epstein-Barr viruses in human saliva and gingival fluid. The new microbiologica, 21(2), 131-139.*

- Holmstrup, P., Plemons, J., & Meyle, J. (2018). Non-plaque-induced gingival diseases. *Journal of clinical periodontology*, 45, S28-S43
- Hung, S. L., Chiang, H. H., Wu, C. Y., Hsu, M. J., & Chen, Y. T. (2012). Effects of herpes simplex virus type 1 infection on immune functions of human neutrophils. *Journal of periodontal research*, 47(5), 635-644.
- Imai, K., Inoue, H., Tamura, M., Cueno, M. E., Inoue, H., Takeichi, O., ... & Ochiai, K. (2012). The periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* induces the Epstein-Barr virus lytic switch transactivator ZEBRA by histone modification. *Biochimie*, 94(3), 839-846.
- Isaka, J., Ohazama, A., Kobayashi, M., Nagashima, C., Takiguchi, T., Kawasaki, H., ... & Hasegawa, K. (2001). Participation of periodontal ligament cells with regeneration of alveolar bone. *Journal of periodontology*, 72(3), 314-323.
- Jayanthi, D., Faizuddin, M., & Noor Ahamadi, H. M. (2017). Association of interferon lambda-1 with herpes simplex viruses-1 and-2, Epstein-Barr virus, and human cytomegalovirus in chronic periodontitis. *Journal of investigative and clinical dentistry*, 8(2), e12200.
- Jepsen, S., Caton, J. G., Albandar, J. M., Bissada, N. F., Bouchard, P., Cortellini, P., ... & Geurs, N. C. (2018). Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and acquired conditions: Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of clinical periodontology*, 45, S219-S229
- Karring, T., Lang, N., & Lindhe, J. (2010). *Tratado de periodontologia clínica e implantologia oral*. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan.
- Kato, A., Imai, K., Ochiai, K., & Ogata, Y. (2013). Higher prevalence of Epstein-Barr virus DNA in deeper periodontal pockets of chronic periodontitis in Japanese patients. *PloS one*, 8(8), e71990.
- Kazi, M. M. A. G., Bharadwaj, R., Bhat, K., & Happy, D. (2015). Association of herpes viruses with mild, moderate and severe chronic periodontitis. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 9(7), DC05.

- Kinane, D. F. (1999). *Periodontitis modified by systemic factors. Annals of Periodontology*, 4(1), 54-63.
- Klemenc, P., Skalerič, U., Artnik, B., Nograšek, P., & Marin, J. (2005). *Prevalence of some herpesviruses in gingival crevicular fluid. Journal of clinical virology*, 34(2), 147-152.
- Klimpel, G. R. (1996). *Immune defenses. In Medical Microbiology. 4th edition. University of Texas Medical Branch at Galveston.*
- Kubo, C. H., Gomes, A. P. M., & Jorge, A. O. C. (2013). *Influência dos métodos de esterilização na capacidade e velocidade de absorção de diferentes marcas comerciais de cones de papel absorvente para endodontia. Revista de Odontologia da UNESP*, 29(1-2), 113-127.
- Kumar, V., Abbas, A. and Aster, J. (2013). *Robbins patologia básica. 9th ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora, pp.309-323.*
- Lamster, I. B., & Novak, M. J. (1992). *Host mediators in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 3(1), 31-60.
- Lang, N. P., & Bartold, P. M. (2018). *Periodontal health. Journal of clinical periodontology*, 45, S9-S16
- Löe, H. (1993). *Periodontal disease: the sixth complication of diabetes mellitus. Diabetes care*, 16(1), 329-334.
- Machado, P. R., Araújo, M. I. A., Carvalho, L., & Carvalho, E. M. (2004). *Mecanismos de resposta imune às infecções Immune response mechanisms to infections. An Bras Dermatol*, 79(6), 647-664.
- Maheaswari, R., Kshirsagar, J. T., & Lavanya, N. (2016). *Polymerase chain reaction: A molecular diagnostic tool in periodontology. Journal of Indian Society of Periodontology*, 20(2), 128.
- Markoulatos, P., Siafakas, N., & Moncany, M. (2002). *Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. Journal of clinical laboratory analysis*, 16(1), 47-51.

- Marsh, P. D. (1994). *Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. Advances in dental research*, 8(2), 263-271.
- McCulloch, C. A. G., & Melcher, A. H. (1983). *Cell density and cell generation in the periodontal ligament of mice. American Journal of Anatomy*, 167(1), 43-58.
- McLaughlin, W. S., Lovat, F. M., Macgregor, I. D. M., & Kelly, P. J. (1993). *The immediate effects of smoking on gingival fluid flow. Journal of clinical periodontology*, 20(6), 448-451.
- Menicanin, D., Hynes, K., Han, J., Gronthos, S., & Bartold, P. M. (2015). *Cementum and periodontal ligament regeneration. In Engineering Mineralized and Load Bearing Tissues (pp. 207-236). Springer, Cham.*
- Méthot, P. O. (2016). *Writing the history of virology in the twentieth century: Discovery, disciplines, and conceptual change. Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 59, 145-153.
- Michalowicz, B. S., Ronderos, M., Camara-Silva, R., & Contreras, A. (2000). *Human herpesviruses and Porphyromonas gingivalis are associated with juvenile periodontitis. Journal of periodontology*, 71(6), 981-988.
- Montgomery, R. I., Warner, M. S., Lum, B. J., & Spear, P. G. (1996). *Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. Cell*, 87(3), 427-436.
- Monzón, J., Acuña, M., Canga, E., & Ortega, S. (2011). *Prevalencia del herpes virus en bolsas periodontales de pacientes asistidos en la Cátedra de Periodoncia de la FOUNNE. Revista de la Fundación Juan José Carraro*, 34.
- Murakami, S., Mealey, B. L., Mariotti, A., & Chapple, I. L. (2018). *Dental plaque-induced gingival conditions. Journal of clinical periodontology*, 45, S17-S27
- Nagatomo, K., Komaki, M., Sekiya, I., Sakaguchi, Y., Noguchi, K., Oda, S., ... & Ishikawa, I. (2006). *Stem cell properties of human periodontal ligament cells. Journal of periodontal research*, 41(4), 303-310.
- Nanci, A., & Bosshardt, D. D. (2006). *Structure of periodontal tissues in health and disease. Periodontology 2000*, 40(1), 11-28.

- Newman., Henry H. and Takei. (2006). *Terapia periodontal. En: Carranza Periodontología clínica. 9a ed. México: Mc Gaw-Hill, 49, 722-29.*
- Offenbacher, S., Barros, S. P., & Beck, J. D. (2008). *Rethinking periodontal inflammation. Journal of periodontology, 79, 1577-1584.*
- Ortega, J. E. M. (2019). *Herpes Virus. BIOZ Revista de Divulgación UACB, 4(3).*
- Page, R. C., & Kornman, K. S. (1997). *The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. Periodontology 2000, 14(1), 9-11.*
- Pihlstrom, B. L., Michalowicz, B. S., & Johnson, N. W. (2005). *Periodontal diseases. The lancet, 366(9499), 1809-1820.*
- Rees, T. D. (1994). *The diabetic dental patient. Dental Clinics of North America, 38(3), 447-463.*
- Rotola, A., Cassai, E., Farina, R., Caselli, E., Gentili, V., Lazzarotto, T., & Trombelli, L. (2008). *Human herpesvirus 7, Epstein–Barr virus and human cytomegalovirus in periodontal tissues of periodontally diseased and healthy subjects. Journal of clinical periodontology, 35(10), 831-837.*
- Saygun, I., Kubar, A., Şahin, S., Şener, K., & Slots, J. (2008). *Quantitative analysis of association between herpesviruses and bacterial pathogens in periodontitis. Journal of periodontal research, 43(3), 352-359.*
- Schwartz, Z. V. I., Goultschin, J., Dean, D. D., & Boyan, B. D. (1997). *Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. Periodontology 2000, 14(1), 158-172.*
- Shapiro, L., Goldman, H., & Bloom, A. (1979). *Sulcular exudate flow in gingival inflammation. Journal of periodontology, 50(6), 301-304.*
- Slots, J., & Contreras, A. (2000). *Herpesviruses: a unifying causative factor in periodontitis? Oral Microbiology and Immunology: Mini-review, 15(5), 277-280.*
- Slots, J., Kamma, J. J., & Sugar, C. (2003). *The herpesvirus–Porphyromonas gingivalis–periodontitis axis. Journal of periodontal research, 38(3), 318-323.*
- Slots, J. (2010). *Human viruses in periodontitis. Periodontology 2000, 53(1), 89*
- Slots, J. (2015). *Periodontal herpesviruses: prevalence, pathogenicity, systemic risk. Periodontology 2000, 69(1), 28-45*

- Slots, J., & Slots, H. (2019). *Periodontal herpesvirus morbidity and treatment. Periodontology 2000*, 79(1), 210-220.
- Socransky, S. S., & Haffajee, A. D. (2005). *Periodontal microbial ecology. Periodontology 2000*, 38(1), 135-187.
- Sugano, N., Ikeda, K., Oshikawa, M., Idesawa, M., Tanaka, H., Sato, S., & Ito, K. (2004). *Relationship between Porphyromonas gingivalis, Epstein-Barr virus infection and reactivation in periodontitis. Journal of oral science*, 46(4), 203-206.
- Sunde, P. T., Olsen, I., Enersen, M., Beiske, K., & Grinde, B. (2008). *Human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in apical and marginal periodontitis: a role in pathology?. Journal of medical virology*, 80(6), 1007-1011.
- Taylor, J. J., & Preshaw, P. M. (2016). *Gingival crevicular fluid and saliva. Periodontology 2000*, 70(1), 7-10.
- Templeton, K. E., Scheltinga, S. A., Beersma, M. F., Kroes, A. C., & Claas, E. C. (2004). *Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4. Journal of clinical microbiology*, 42(4), 1564-1569.
- Tonetti, M. S., Eickholz, P., Loos, B. G., Papapanou, P., Van Der Velden, U., Armitage, G., ... & Kocher, T. (2015). *Principles in prevention of periodontal diseases: consensus report of group 1 of the 11th European Workshop on Periodontology on effective prevention of periodontal and peri-implant diseases. Journal of clinical periodontology*, 42, S5-S11.
- Trombelli, L., Farina, R., Silva, C. O., & Tatakis, D. N. (2018). *Plaque-induced gingivitis: Case definition and diagnostic considerations. Journal of clinical periodontology*, 45, S44-S67.
- Valente, J. J. M. (2018). *Os efeitos da cessação tabágica no tratamento periodontal não-cirúrgico da periodontite crónica (Doctoral dissertation)*.
- Weyant, R. J., Pearlstein, M. E., Churak, A. P., Forrest, K., Famili, P., & Cauley, J. A. (1999). *The association between osteopenia and periodontal attachment loss in older women. Journal of periodontology*, 70(9), 982-991.

Zaveri, H., Rathva, V., Sant, A., & Dave, D. (2016). Viruses: a conundrum in periodontal diseases-a review. Int J Ora Max Dis, 1(1), 14-21.

Zmora, N., Bashiardes, S., Levy, M., & Elinav, E. (2017). The role of the immune system in metabolic health and disease. Cell Metabolism, 25(3), 506-521.

VII. Anexos

ANEXO 1 - Aprovação da comissão de Ética do Instituto Universitário Egas Moniz

Comissão de Ética



Proc. Interno nº 708

Ex.ma Senhora
Marta Costa Picolo

Monte de Caparica, 19 de março de 2019.

Ex.ma Senhora,

Em resposta ao Pedido de Parecer que submeteu à apreciação da Comissão de Ética da Egas Moniz, com o tema denominado **“Pesquisa de vírus em bolsas periontotais de doentes com periodontite crónica”**, foi aprovado por unanimidade.

Com os melhores cumprimentos,

A Presidente da Comissão de Ética da Egas Moniz

Prof.^a Doutora Maria Fernanda de Mesquita

ANEXO 2 - Consentimento Informado



Consentimento Informado

Código | [IMREH.PS.17_02](#)

De acordo com a Declaração de Helsínquia de 2013¹ e a Convenção de Oviedo²

Monte de Caparica, dia 20 de Fevereiro de 2019

Exmo.(a) Sr.(a),

No âmbito do Mestrado Integrado de Medicina Dentária na Unidade Curricular de Orientação Tutorial de Projeto Final subordinado ao tema: "Pesquisa de Vírus em Bolsas Periodontais de Doentes com Periodontite Crónica.", sob a orientação do Professor Doutor Francisco Salvado e coorientação da Prof. Doutora Helena Barroso, solicita-se a sua autorização para participação neste estudo.

O Estudo irá decorrer nas instalações da Clínica Dentária Egas Moniz, abrangendo os doentes que frequentam a Clínica Dentária Egas Moniz, do(a) Instituto Universitário Egas Moniz. As amostras obtidas serão posteriormente tratadas e analisadas no Laboratório de Microbiologia do Instituto Universitário Egas Moniz para a pesquisa de três vírus específicos.

A Doença Periodontal é uma doença inflamatória dos tecidos de suporte do dente, como a gengiva e o osso. A acumulação de placa bacteriana apresenta-se como sendo a sua causa primária, no entanto, estudos recentes demonstram a presença de certos vírus no fluido gengival (fluido presente no sulco entre a gengiva e o dente), nomeadamente os que me proponho a estudar, e que podem ter influência na própria doença periodontal.

A participação neste estudo é voluntária e a sua não participação não lhe trará qualquer prejuízo.

Solicita-se a sua autorização para:

- 1) Participar no estudo "Pesquisa de Vírus em Bolsas Periodontais de Doentes com Periodontite Crónica.";

¹ <http://www.unhcr.org/refugees/article/48c4b222.html>

² <http://www.unhcr.org/refugees/article/48c4b222.html>



Consentimento Informado

Código: [IUP-EM-PS-17_02](#)

- 2) A recolha de uma amostra de fluido gengival através de um cone de papel, onde se coloca o cone entre a gengiva e o dente, permitindo a absorção de fluido gengival e a posterior análise laboratorial para a pesquisa de certos Vírus.
- 3) Utilização dos dados recolhidos no questionário para tratamento de dados.

A fim de esclarecer a minha decisão recebi, e bem compreendi, as informações seguintes:

- 1) Todos os dados recolhidos durante o estudo serão mantidos confidenciais, sendo utilizados somente para dados estatísticos.
- 2) Será mantido o meu anonimato, perante os investigadores principais do projeto e os dados serão tratados de forma anónima;
- 3) O estudo tem como objetivo contribuir de uma forma direta e indireta para a formação do aluno em causa, sendo parte integrante do seu trabalho final de curso, no Mestrado Integrado em Medicina Dentária do Instituto Universitário Egas Moniz.
- 4) Será feito um procedimento clínico simples e rápido, para a recolha de fluido gengival, com o auxílio a um cone de papel.
- 5) Os dados fornecidos no questionário são confidenciais e serão utilizados apenas para tratamento de dados.
- 6) Conservo todos os meus direitos garantidos na lei;
- 7) O meu consentimento não libera em nada os investigadores responsáveis deste trabalho das suas responsabilidades, no que diz respeito à investigação biológica e ética;

Deste modo permitirei:

- A recolha de amostra de fluido gengival através de cones de papel, para posterior tratamento laboratorial.
- A utilização dos dados cedidos em questionário, apenas para tratamento de dados.



Consentimento Informado

Código: 147/2017_02

Este estudo pode trazer benefícios tais como, contribuir para:

- Evidenciar a ausência ou presença de vírus em amostras de fluido gengival. Este estudo pode trazer, também, benefícios indiretos tais como contribuir para a compreensão da influência viral na doença periodontal e suas implicações clínicas designadamente nas estratégias de prevenção, diagnóstico e tratamento da doença.

A informação recolhida destina-se unicamente a tratamento estatístico e/ou publicação e será tratada pelo(s) orientador(es) e/ou pelo mandatado.

Aceito participar nesta investigação nas condições acima referidas e autorizo a recolha, escolha e tratamento dos dados, que se mantém confidenciais e sob anonimato, apenas por pessoas mandatadas pelo Prof. Doutor Francisco Salvado.

Com os melhores cumprimentos,

Marta Picolo, aluna do Mestrado Integrado em Medicina Dentária do Instituto Universitário Egas Moniz.

Contacto telefónico: +351 915743283 | Endereço eletrónico: martapicolo@gmail.com

(Riscar o que não interessa)

ACEITO/NÃO ACEITO participar neste estudo, confirmando que fui esclarecido sobre as condições do mesmo e que não tenho dúvidas.

(Assinatura do participante ou, no caso de menores, do pai/mãe ou tutor legal)

