

Universidade de Lisboa
Faculdade de Medicina Dentária



O PAPEL DOS HERPESVÍRUS NA ETIOPATOGENIA DA DOENÇA PERIODONTAL

Sara Santos Mendes

Dissertação

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

2015

Universidade de Lisboa
Faculdade de Medicina Dentária



O PAPEL DOS HERPESVÍRUS NA ETIOPATOGENIA DA DOENÇA PERIODONTAL

Sara Santos Mendes

Dissertação orientada pela Doutora Susana Canto de
Noronha

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

2015

“Um homem precisa de viajar para lugares que não conhece para quebrar essa arrogância que nos faz ver o mundo como o imaginamos, e não simplesmente como é ou pode ser; que nos faz professores e doutores do que não vimos, quando deveríamos ser simplesmente alunos, e simplesmente ir ver”

Amyr Kink

Agradecimentos

À Doutora Susana Noronha pela orientação e disponibilidade prestadas durante o desenvolvimento deste trabalho.

À minha mãe, pai, Anthony, Inês e Joana pela paciência, por me terem apoiado incondicionalmente ao longo do meu percurso académico e durante todas as escolhas da minha vida.

À Marta, Telma, Maria e Nuno pela amizade duradoura, compreensão e pelo inteiro apoio.

Ao Alexandre pelo companheirismo e por acreditar sempre em mim.

A todos os colegas de curso, especialmente ao Gonçalo, Vanessa Neves, David e Miguel.

Ao Ivo, Catarina e Mónica por terem estado ao meu lado durante estes cinco anos, pela partilha de muitos momentos, bons e maus, pelo trabalho árduo e o riso constante; por nunca desistirem de lutar por aquilo em que acreditam.

Resumo

Introdução: A associação entre bactérias e a etiologia da doença periodontal é irrefutável, no entanto, tem sido amplamente sugerido na literatura a existência de um papel dos herpesvírus na etiopatogenia da mesma.

Objetivo: Rever a literatura existente desde o ano 2000 de modo a depreender o papel dos herpesvírus na etiopatogenia da doença periodontal descrevendo os mecanismos específicos de tal correlação e apresentando os argumentos a favor e as limitações da hipótese.

Materiais e Métodos: A pesquisa foi realizada entre Outubro de 2014 e Janeiro de 2015 nas bases de dados secundárias (*Cochrane Database of Systematic Reviews* e *Evidence Based Dentistry*) e primárias (LILACS e *Medline*- através do motor de busca *Pubmed*) com os seguintes limites: artigos em Inglês, Português ou Espanhol desde 01/01/2000 até 31/01/2015 aplicados somente em humanos. Foram utilizadas combinações dos termos “Herpes vírus”, “Doença Periodontal”, “herpes vírus”, “periodontal disease” e “periodontitis”. Os artigos considerados adequados com base nos seus títulos e *abstracts* foram sujeitos a uma leitura aprofundada do seu conteúdo; os artigos foram excluídos segundo os seguintes critérios: desadequação ao tema, referência ao vírus da imunodeficiência humana, referência a peri-implantite e metodologias pouco explícitas. A bibliografia dos artigos incluídos foi consultada e os autores dos artigos sem acesso foram contactados de modo a obter artigos considerados adequados. Um total de 64 artigos foi revisto.

Evidência científica: O EBV, CMV e HSV são detetados com elevada frequência na placa subgingival, saliva e fluido crevicular. Estes vírus possuem mecanismos patogénicos que interferem com a resposta imunológica do hospedeiro diminuindo-a. Os herpesvírus parecem aumentar o número e a patogenicidade de bactérias periodontopatógenas.

Conclusão: Não é possível estabelecer a existência de uma associação entre os herpesvírus e a etiopatogenia da doença periodontal. São necessários mais estudos, longitudinais e com protocolos homogêneos entre si.

Palavras-chave

Herpesvírus; doença periodontal; etiopatogenia; citomegalovírus; Epstein-barr; vírus herpes simples.

Abstract

Introduction: Although the association between bacteria and the etiology of periodontal disease is irrefutable, it has been suggested in the literature that herpesviruses play a role in the etiopathogenesis of periodontitis.

Purpose: To review the existing literature after the year 2000 to perceive the role of herpesviruses in the etiopathogenesis of periodontal disease, describing the specific mechanisms of such correlation and the arguments forward as well the limitations of the hypothesis.

Material and Methods: Searches were conducted between October 2014 and January 2015 in secondary databases (*Cochrane Database of Systematic Reviews* and *Evidence Based Dentistry*) and primary databases (LILACS e MEDLINE - through *Pubmed*) restricting the search to articles in English, Portuguese and Spanish from 01/01/2000 to 31/01/2015, only applied in humans. It was applied a combination of the keywords “Herpes vírus” “Doença Periodontal”, “herpes vírus”, “periodontal disease” and “periodontitis”. The encountered articles considered relevant through their titles and abstracts were subjected further reading; articles were excluded through specific criteria: no relevance to the subject matter, mention to the human immunodeficiency virus, mention to peri-implantitis and articles without clear methodologies. The bibliography of the included articles and the authors of the articles without free access were consulted in order to obtain relevant articles. A total of 64 articles were reviewed.

Scientific evidence: EBV, HCMV and HSV are commonly detected with high rates in subgingival samples, saliva and crevicular fluid. These viruses have pathogenic mechanisms that intervene and diminish the immunologic response of the host. Herpesviruses seem to increase the number and pathogenicity of periodontopathic bacteria.

Conclusion: It is not possible to affirm with certainty that there is an association between herpesviruses and the etiopathogenesis of periodontal disease. More longitudinal studies with homogeneous protocols are needed.

Keywords

Herpesvirus; periodontal disease; etiopathogenesis; cytomegalovirus; Epstein-barr; herpes simplex virus

Índice

1. Introdução	1
2. Revisão da literatura	2
2.1. A doença periodontal	2
2.2. Dificuldades na determinação da etiopatogenia da doença periodontal	6
2.3. Introdução à virologia	6
2.4. Família <i>herpesviridae</i>	7
2.4.1 Vírus herpes simples.....	8
2.4.2 Vírus Epstein-Barr.....	9
2.4.3 Citomegalovírus humano.....	10
3. Relação dos herpes vírus com a doença periodontal	10
4. Evidência científica da relação dos herpesvírus com a doença periodontal	11
4.1 Detecção de herpes vírus em tecido gengival	11
4.2. Detecção de herpes vírus em fluido crevicular	12
4.3. Detecção de herpes vírus na placa subgengival	12
4.4. Detecção de herpes vírus na saliva.....	15
4.5 Associação entre a reativação viral com a periodontite.....	16
4.6 Associação com a severidade da doença periodontal	16
4.7 Efeitos citotóxicos diretos.....	18
4.8 Efeitos na resposta imunológica	18
4.8.1 Influência do CMV na resposta imunológica.....	20
4.8.2 Influência do HSV na resposta imunológica	20
4.8.3 Influência do EBV na resposta imunológica	20
4.9 Relação com as bactérias periodontopatogénicas.....	21
5. Influência nas terapêuticas periodontais.....	23
6. Modelo para a Periodontite associada a herpes vírus	23
7. Discussão	24
8. Conclusões	30
Referências Bibliográficas	iii
Anexos.....	iv

Lista de Abreviaturas

A.actinomyetemcomitans: *Aggregatibacter actinomyetemcomitans*

ADN: Ácido desoxirribonucleico

Células NK: Células *natural killer*

CMV: Citomegalovírus humano

C.rectus: *Campylobacter rectus*

D.pneumosintes: *Dialister pneumosintes*

EBV: Epstein-Barr vírus

EBV-1: Epstein-Barr vírus tipo 1

EBV-2: Epstein-Barr vírus tipo 2

Fc: Porção constante das imunoglobulinas

gB-I: gene gB- I

gB-IV: gene gB- IV

HHV : Herpesvírus humano

HHV-6: Herpesvírus humano 6

HHV-7: Herpesvírus humano 7

HHV-8: Herpesvírus humano 8

HSV :Vírus herpes simples

HSV-1:Vírus herpes simples tipo 1

HSV-2: Vírus herpes simples tipo 2

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

IL-1: Interleucina-1

IL-1 α : Interleucina-1 alfa

IL-1 β : Interleucina-1 beta

IL-2: Interleucina-2

LB: Linfócitos B

LT: Linfócitos T

MHC: Complexo de histocompatibilidade major

MMPs: Metaloproteinases de matriz

PCR: Reação em cadeia de polimerase

P. gingivalis: *Porphyromonas gingivalis*

P.intermedia: *Prevotella intermedia*

PMN: Polimorfonucleados

T.forsythia: *Tanerella forsythia*

TLR-9: Recetor do tipo Toll 9

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

VIH: Vírus da Imunodeficiência Humana

1. Introdução

A Doença Periodontal é uma doença multifatorial e, como tal, têm sido apontados na literatura inúmeros fatores etiológicos assim como vários fatores de risco da periodontite. Embora a flora bacteriana seja o agente etiológico principal, a ocorrência de doença periodontal em determinados grupos da população não está totalmente esclarecida e o papel de outros agentes etiológicos, nomeadamente virais, tem sido investigado (Ambili et al., 2014). A existência de um biofilme bacteriano subgingival é insuficiente para explicar a variabilidade de apresentações clínicas de periodontite (Rao et al., 2012.), fases de remissão e ativação de doença, a tendência da destruição periodontal para ser bilateral, simétrica e localizada (Munksgaard, 2003), um padrão agressivo de destruição periodontal em localizações com pouca placa bacteriana (Bilichodmath et al., 2009), quadros de gengivite em pacientes com fatores de risco clássicos para a doença periodontal (Farias et al., 2013) entre outras características. Neste sentido, nos últimos anos têm surgido um número crescente de estudos que estabelecem uma relação entre os herpesvírus, nomeadamente o citomegalovírus humano (CMV), Epstein-barr (EBV) e herpes simples (HSV) com a patogénese da doença periodontal (Grenier et al., 2005).

Dados presentes na literatura sugerem um aumento da frequência de deteção de vírus pertencentes a família *Herpesviridae* como o EBV, CMV e HSV-1 em várias formas de doença periodontal. Estes vírus possuem mecanismos biológicos que podem modificar o microambiente periodontal favorecendo o estabelecimento de uma flora mais patogénica e influenciando processos patogénicos e (Konstantinidis et al., 2005) poderão causar doença de uma forma direta através da infeção e replicação viral ou através de dano criado às defesas do hospedeiro (Rao et al., 2012; Slots, 2010b)

A compreensão da influência dos herpes vírus na etiopatogenia da doença periodontal pode acarretar implicações clínicas designadamente nas estratégias de prevenção, diagnóstico e tratamento da doença (Ambili et al., 2014).

O objetivo desta revisão é, portanto, compreender o papel dos herpesvírus na etiopatogenia da Doença Periodontal, descrever os mecanismos específicos de tal correlação e apresentar os argumentos a favor e as limitações de tal hipótese.

Foi realizada uma pesquisa da literatura entre Outubro de 2014 e Janeiro de 2015 nas bases de dados secundárias *Cochrane Database of Systematic Reviews* e *Evidence Based Dentistry* e primárias LILACS e *Medline* (através do motor de busca *Pubmed*). Foram efetuadas duas pesquisas distintas na base de dados LILACS, uma com termos de pesquisa em português (“Herpes vírus e Doença periodontal”) e outra com termos de pesquisa em Inglês (“herpes vírus” AND “periodontal disease” utilizando como limites artigos em inglês, português e espanhol aplicados em humanos. Na pesquisa na base de dados primária *Medline* foram usados conectores booleanos e termos MeSH com combinações dos termos “herpes vírus”, “Periodontal disease” e “periodontitis” utilizando como limites artigos escritos em Inglês, Português ou Espanhol desde 01/01/2000 até 31 de Janeiro de 2015 aplicados somente em humanos. Os artigos considerados adequados com base nos seus títulos e *abstracts* foram sujeitos a uma leitura aprofundada do seu conteúdo; os artigos foram excluídos segundo os seguintes critérios: desadequação ao tema, referência ao vírus da imunodeficiência humana, referência a peri-implantite e metodologias pouco explícitas. A bibliografia dos artigos incluídos foi, ainda, consultada de modo a obter artigos considerados adequados. Foram contactados os autores dos artigos sempre que necessário de modo a incluir artigos de interesse sem acesso. O resumo da metodologia aplicada pode ser conferido no ANEXO I.

2. Revisão da literatura

2.1. A doença periodontal

O periodonto sadio é uma estrutura complexa e dinâmica de tecidos moles e duros - cemento, mucosa gengival (epitélio e conjuntivo), ligamento periodontal e osso alveolar que, no seu conjunto, providenciam o suporte do dente (Gustavo et al., 2012).

A doença periodontal é uma condição inflamatória crónica que afeta as estruturas de suporte do dente (Gustavo et al., 2012) estando entre as doenças mais prevalentes em humanos (Imai et al., 2012). Embora possa ter diversas causas, a gengivite e periodontite induzidas por placa constituem as formas mais comuns de doença (Armitage, 2004). Por um lado a gengivite induzida por placa é definível como a presença de inflamação sem que haja perda de tecido conjuntivo de suporte (Armitage,

2004); é reversível se o fator etiológico for eliminado e pode tornar-se crônica na sua persistência (Tonetti et al., 2015). Por outro lado, a periodontite pressupõe a existência de inflamação gengival em localizações onde houve migração apical do epitélio e perda de tecido conjuntivo e osso alveolar (Armitage,2004); a destruição tecidual é irreversível resultando na perda progressiva de suporte dentário e, em última instância, na perda dentária (Tonetti et al., 2015). Eritema, edema, hemorragia à sondagem, perda de inserção comprovada pelo aumento de profundidade à sondagem, formação de bolsas periodontais (Armitage, 2004), mobilidade dentária, perda de osso alveolar são algumas das características da doença periodontal (Offenbacher et al., 2008; Imai et al., 2012).

Nem todos os pacientes com gengivite evoluem para um quadro de periodontite (Chapple et al., 2015), ainda que a doença esteja dependente de um biofilme (Tonetti et al., 2015) está também envolvida a suscetibilidade do indivíduo determinada por um conjunto de fatores de risco (Chapple et al., 2015). Na literatura estão descritos inúmeros fatores de risco para a doença periodontal entre os quais o tabagismo, doenças sistêmicas como a diabetes mellitus (Tonetti et al., 2015) , fatores nutricionais e *stress* psicológico (Chapple et al., 2015). A predisposição genética como fator de risco para o desenvolvimento de periodontite tem sido, também, amplamente estudada (Timmerman & van der Weijden, 2006) .

Embora as bactérias sejam necessárias para causar doença, (Gustavo et al.,2012;Wiley, 2013) os fatores de risco do hospedeiro podem, inclusive, ter maior influência do que a causa bacteriana para que a doença ocorra (Page & Kornman, 1997).

As infecções periodontais são polimicrobianas envolvendo bactérias gram-positivas e gram-negativas (Munksgaard, 2003); um número limitado de bactérias gram-negativas anaeróbias é apontado na literatura como patógenos principais da doença periodontal (Munksgaard, 2003; Saygun et al., 2008) entre os quais a *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* (Munksgaard, 2003). Este conjunto de bactérias possui uma associação forte com a severidade da doença, constituem o complexo vermelho de Socransky (Socransky & Haffajee, 2005) e estão relacionadas com características clínicas de periodontite como a profundidade das bolsas periodontais e hemorragia à sondagem (Grenier et al., 2009). Outras bactérias estão também correlacionadas com o aparecimento de doença periodontal nomeadamente a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Wiley, 2013).

A gengivite baseia-se numa resposta inflamatória não específica a uma acumulação de placa bacteriana adjacente à gengiva podendo ser inicial, precoce ou estabelecida. A lesão estabelecida pode evoluir para lesão avançada, com destruição tecidual, caso exista algum fator que desequilibre a relação hospedeiro-bactéria. Crescente evidência científica tem vindo a demonstrar que é a resposta inflamatória e imune não controlada que despoleta a destruição tecidual (Wiley, 2013) e perda de inserção periodontal (Armitage & Cullinan, 2010), ou seja, o verdadeiro poder destrutivo das bactérias é sentido indiretamente através da perturbação da homeostasia entre a microbiota subgengival e a respostas do hospedeiro suscetível (Gustavo et al., 2012). Uma compreensão mais abrangente da patogénese da doença periodontal pode ser conseguida através da interpretação do modelo descrito por Offenbacher em 1996 (consultar anexo II).

Estão descritas sete categorias distintas de doença periodontal destrutiva e enumeradas mais de quarenta formas de doença gengival (ver anexo III) sendo a gengivite classificável, segundo a severidade, em inicial, moderada ou severa com base em achados clínicos subjetivos como a intensidade da inflamação gengival (eritema, edema e hemorragia) e, segundo as localizações envolvidas, como localizada se até 30% das localizações estão afetadas ou generalizada se o número de localizações for superior a 30% (Armitage, 2004).

A periodontite crónica é a forma mais prevalente da doença, afeta maioritariamente adultos com idade superior a 30 anos e é clinicamente caracterizável por depósitos substanciais de placa e cálculo associados a inflamação gengival, perda de inserção e bolsas periodontais. Usualmente a doença progride de forma lenta embora possam existir períodos de rápida perda de inserção. Está associada a um padrão microbiológico variável podendo ser modificada por fatores predisponentes locais, fatores de risco e doenças sistémicas. A forma crónica de periodontite é considerada localizada ou generalizada consoante a percentagem de localizações afetadas, tal como descrito anteriormente para a gengivite (Armitage, 2004) havendo uma tendência para ser bilateral e simétrica (Armitage & Cullinan, 2010). A severidade é determinada pela perda de inserção, deste modo, doença inicial corresponde a uma perda de 1-2 mm, moderada a uma perda de 3-4 mm e é considerada severa se a perda for superior a 5mm. A perda de inserção clínica é medida com recurso de uma sonda periodontal e

corresponde à distância da junção amelocementária até à base do sulco ou bolsa (Armitage, 2004).

A periodontite agressiva é uma forma menos comum de doença (Armitage, 2004) afetando maioritariamente indivíduos mais jovens do que a forma crónica (Armitage & Cullinan, 2010). Tem como características primárias afetar, geralmente, indivíduos saudáveis, possuir um padrão familiar e ter rápida perda de inserção e destruição óssea (Armitage, 2004). A perda de inserção é três a quatro vezes mais rápida do que na forma crónica (Armitage & Cullinan, 2010). Possui outras características nem sempre presentes como depósitos microbianos inconsistentes com os níveis de destruição e perda de inserção. É localizada se forem somente afetados zonas interproximais dos primeiros molares permanentes e incisivos sendo esta forma detetada, normalmente, na puberdade e correspondendo etiologicamente a uma resposta exuberante dos anticorpos aos patógenos periodontais (Armitage, 2004; Slots, 2010b). Se, por outro lado, estiver presente em pelo menos mais três dentes que o anteriormente referido a doença é considerada generalizada e é normalmente detetada antes dos 30 anos de idade correspondendo a uma resposta fraca dos anticorpos aos patógenos periodontais (Armitage, 2004). É provável que as formas crónica e agressiva de periodontite não constituam entidades patológicas distintas mas que pertençam a um contínuo espectro da mesma doença cuja expressão clínica dependa de agentes infecciosos específicos e do estado imune do indivíduo (Saygun et al., 2004).

A prevenção da periodontite consiste em travar o processo inflamatório através da disrupção e remoção do biofilme bacteriano, recurso a métodos adicionais farmacológicos ou de modulação da resposta do hospedeiro e através do controlo de fatores de risco como o tabagismo e a diabetes (Tonetti et al., 2015). O método mais eficaz no controlo da doença periodontal consiste na higiene oral realizada pelo paciente associada a uma remoção ou intervenção profissional (Drisko, 2001) assim como no controlo de fatores de risco (Pihlstrom et al., 2005). A remoção profissional de placa bacteriana e cálculo passa pela utilização de instrumentos manuais ou mecanizados- tratamento periodontal não-cirúrgico. Em alguns pacientes com doença avançada pode ser necessário recorrer a cirurgia periodontal (Pihlstrom et al., 2005).

2.2. Dificuldades na determinação da etiopatogenia da doença periodontal

Apesar dos esforços de investigação subsistem campos em aberto relativamente à etiopatogenia e evolução clínica da doença periodontal (Monzón et al., 2011). Alguns dos obstáculos estão associados a dificuldades de diagnóstico, variações no curso da doença e conhecimento insuficiente acerca do processo infeccioso da mesma (Slots et al., 2003).

Conquanto se reconheça a causa bacteriana como indispensável para o desenvolvimento da doença periodontal esta não é suficiente para explicar algumas das características da mesma (Kato et al., 2013; Chalabi et al., 2010; Saygun et al., 2004; Saygun et al., 2008; Rotola et al., 2008) como a sua tendência para seguir um padrão localizado em alguns indivíduos, a propensão existente para a destruição tecidual ser bilateral e simétrica, o desenvolvimento não linear da doença contendo episódios de atividade e exacerbação intervalados com períodos de remissão (Slots et al., 2002; Saygun et al., 2004; Watanabe et al., 2007), uma padrão de destruição agressivo na presença de pouca placa bacteriana (Bilichodmath et al., 2009) e quadros de gengivite em pacientes com fatores de risco clássicos para a doença periodontal (Farias et al., 2013). Vários estudos demonstraram a ausência de bactérias putativas periodontais em pacientes com doença periodontal e a inexistência de uma diferença significativa na prevalência de bactérias no periodonto saudável e periodonto afetado por doença (Ledder et al., 2007; Riep et al., 2009). Adicionalmente, uma das questões mais controversas em periodontologia prende-se com os eventos patogénicos que levam a conversão de uma situação de gengivite para uma situação de periodontite (Chalabi et al., 2010) ou de uma forma estável de doença para uma fase ativa da mesma (Slots et al., 2003). Embora não exista uma resposta detalhada para estas questões, a variação das manifestações clínicas de periodontite é provavelmente consequência do tipo e quantidade de agentes infecciosos associados as defesas do hospedeiro (Echeverría et al., 2007; Slots et al., 2002).

2.3. Introdução à virologia

Os vírus são agentes intracelulares obrigatórios, dependentes de células vivas para se replicarem e metabolicamente inertes no exterior da célula hospedeira (Senra & Kerbauy, 2009; Pérez et al., 2011; Monzón et al., 2011). Embora possuam algumas

propriedades dos sistemas vivos tal como um genoma específico e a capacidade de se multiplicarem, são entidades infecciosas sem vida (Pérez et al., 2011).

2.4. Família *herpesviridae*

A família *herpesviridae* é composta por vírus que partilham como estrutura comum uma dupla cadeia de ADN rodeada por uma cápside icosaédrica contendo 162 capsómeros envolvidos por uma matriz proteica não estruturada – tegumento- que, por sua vez, está rodeada por uma camada bilipídica- envelope- com glicoproteínas ramificadas embebidas (Kukhanova et al., 2014; Slots, 2004; Slots, 2005). Além das características acima mencionadas os herpesvírus têm em comum tropismo tecidual (alta seletividade para os tecidos e órgãos que infetam) e possuem uma fase produtiva à qual se segue uma fase de latência que assegura a sobrevivência do genoma viral (Contreras & Slots, 2000). Ocasionalmente os herpes vírus latentes podem sofrer reativação e reentrar numa fase produtiva (Contreras & Slots, 2000).

Atualmente estão identificadas aproximadamente 120 formas distintas de herpes vírus (Cappuyns et al., 2005) sendo que apenas oito infetam humanos (Escalona & Limonchy, 2009; Monzón et al., 2011; Slots & Slots, 2011): Vírus herpes simples (HSV), tipo 1 e 2, Vírus Varicella-Zoster (VZV), Vírus Epstein- Barr (EBV), Citomegalovírus humano (CMV) e Herpesvírus humano (HHV-6, HHV-7 e HHV-8). Os herpesvírus humanos são classificados em três subfamílias, α , β e γ , consoante o seu tropismo tecidual, patogenicidade e comportamento em condições de cultura em laboratório (Senra & Kerbauy, 2009).

A subfamília Alphaherpesvirinae, α , compreende vírus que na forma lítica têm um ciclo de vida relativamente curto e uma replicação rápida e que, na sua forma latente, se estabelecem usualmente, em gânglios sensitivos (Cappuyns et al., 2005; Escalona & Limonchy, 2009).

Os vírus pertencentes à subfamília Betaherpesvirinae, β , têm ciclos de vida longos embora a progressão da infeção seja lenta; as células infetadas com estes vírus proliferam e aumentam de tamanho- citomegalia; a infeção latente localiza-se em glândulas secretórias, rins e outros tecidos. Tanto o citomegalovírus humano (CMV) como o herpes vírus humano 6 e 7 pertencem à subfamília β (Cappuyns et al., 2005; Escalona & Limonchy, 2009)

Herpes vírus humano associado ao Sarcoma de Kaposi (HHV-8), Epstein-Barr vírus (EBV) associado ao linfoma de Burkitt e à mononucleose infecciosa pertencem ao grupo Gammaherpesvirinae, γ (Kukhanova et al., 2014). O EBV e HHV-8 infetam linfócitos B e T embora também possam ter atividade citolítica para células epiteliais e fibroblastos (Escalona & Limonchy, 2009); a latência ocorre frequente em tecidos linfoides (Cappuyns et al., 2005).

Tabela 1- Herpesvírus que infetam humanos. Adaptado de Senra & Kerbauy, 2009.

Herpesvírus	Abreviatura	Grupo
Vírus herpes simples tipo 1	HSV-1	α
Vírus herpes simples tipo 2	HSV-2	α
Vírus Varicella-Zoster	VZV	α
Vírus Epstein-Barr	EBV	γ
Citomegalovírus humano	CMV	β
Herpesvírus humano 6	HHV-6	β
Herpesvírus humano 7	HHV-7	β
Herpesvírus humano 8	HHV-8	γ

2.4.1 Vírus herpes simples

O HSV-1 e o HSV-2 são os dois tipos de herpes simples que afetam usualmente a pele e mucosa (Cappuyns et al., 2005) e são transmitidos através do contacto direto com lesões pré-existentes ou saliva ou outras secreções infetadas (Contreras & Slots, 2000). Outras formas de transmissão incluem autoinoculação e transmissão do vírus de mães infetadas para recém-nascidos (Cappuyns et al., 2005). O HSV-1 causa, maioritariamente, infeções orais e o HSV-2 infeções ano-genitais (Sushma et al., 2012; Slots, 2005). No local da infeção epitelial os antigénios virais são responsáveis por despoletar uma resposta imune mediada por células que pode conduzir a recuperação (se ocorrer lise das células infetadas) ou a um período de latência (se for suprimida a expressão do ADN viral) (Cappuyns et al., 2005). O HSV-1 é capaz de infetar e de se replicar em células da mucosa oral como queratinócitos e fibroblastos gengivais; adicionalmente este vírus foi encontrado em linfócitos T e monócitos/macrófagos de amostras de periodontite crónica (Hung et al., 2012). Para um melhor entendimento das patologias e manifestações orais deste vírus consultar o ANEXO IV,

Após a replicação viral nas células epiteliais alguns nucleocapsídeos ascendem a neurónios sensitivos por transporte axonal retrógrado estabelecendo-se de forma latente no gânglio espinal ou cerebral correspondente (Das et al., 2012). A reativação viral pode ocorrer a qualquer momento despoletada por imunossupressão, *stress*, trauma, radiação

ultravioleta ou febre. Os mecanismos específicos da reativação ainda permanecem incógnitos (Cappuyns et al., 2005)

2.4.2 Vírus Epstein-Barr

O EBV é usualmente transmitido por secreções orais, nomeadamente através da saliva (Wu et al., 2007) e sangue e a replicação viral ocorre em células epiteliais ou linfócitos B da orofaringe (Cappuyns et al., 2005). Estabelece-se uma infeção latente quando este vírus passa do epitélio da orofaringe para os linfócitos B (Imai et al., 2012) sendo os linfócitos B de memória a principal fonte de persistência do vírus (Cappuyns et al., 2005).

A infeção por EBV em crianças resulta maioritariamente numa afeção subclínica contrariamente ao que ocorre em adultos culminando em mononucleose infecciosa. Pode ser, também, associado a outras doenças como doenças auto-imunes e oncológicas (Cappuyns et al., 2005) nomeadamente linfoma de Burkitt e carcinoma da nasofaringe (Sugano et al., 2004; Imai et al., 2012) (ver ANEXO IV). A sintomatologia é atribuível, na maior parte dos casos, à ativação e proliferação de linfócitos T como resposta à infeção (Cappuyns et al., 2005; Escalona & Limonchy, 2009).

Existem dois tipos distintos de EBV: 1 e 2 (Klemenc et al., 2005; Slots et al., 2006). A maioria dos indivíduos saudáveis caucasianos são infetados com EBV tipo 1 (EBV-1) enquanto que indivíduos com imunossupressão (infetados com VIH e pacientes transplantados) detêm elevadas taxas de infeção com EBV-2 (Wu et al., 2007). O EBV-1 parece estar associado à doença periodontal humana e o tipo 2 sugere ter uma associação leve ou mesmo nula com a doença (Moghim et al., 2007; Chalabi et al., 2008).

A evidência que leva a pontar a existência de uma associação entre o EBV e a doença periodontal baseia-se em resultados de estudos que detetaram uma prevalência aumentada deste em tecidos gengivais, fluído crevicular e placa subgengival de localizações comprometidas relativamente a localizações livres de doença (Escalona & Limonchy, 2009). A sua reativação em localizações periodontalmente comprometidas é considerada um evento importante no desenvolvimento de periodontite, os mecanismos de reativação e que produzem doença a partir do EBV ativado não se encontram esclarecidos (Kato et al., 2013).

2.4.3 Citomegalovírus humano

O CMV é a principal causa de infecções congénitas e perinatais cuja transmissão materna ocorre através da placenta durante o parto ou durante a amamentação. Este vírus infeta vários tipos de células epiteliais, endoteliais, do músculo liso, mesenquimatosas, hepatócitos, granulócitos e macrófagos derivados de monócitos, como consequência, o CMV pode ser encontrado em variadas secreções como na saliva ou urina (Cappuyns et al., 2005). Nos tecidos periodontais este vírus infeta monócitos/macrófagos e também linfócitos T periodontais (Wu et al., 2007; Lin & Li, 2009)

De acordo com a sequência do gene gB, que codifica uma glicoproteína na membrana externa do CMV, este vírus pode ser dividido em quatro genótipos distintos-gB-I a gB-IV. Estudos prévios demonstraram que diferentes genótipos deste vírus podem exibir diferentes capacidades patogénicas e a sua prevalência varia consoante os grupos étnicos e localização geográfica (Wu et al., 2007). Está referido na literatura que este vírus é o herpesvírus mais frequentemente encontrado em bolsas periodontais (Botero et al., 2008).

3. Relação dos herpes vírus com a doença periodontal

Desde meados da década de 90 que os vírus da família *herpesviridae* têm sido associados à patogénese de diversos tipos de doença periodontal (Pérez et al., 2011; Wu et al., 2007) nomeadamente o Citomegalovírus humano (CMV), Epstein-Barr (EBV) e Herpes vírus simples (HSV) (Escalona & Limonchy, 2009; Slots et al., 2003; Monzón et al., 2011; Wu et al., 2007; Foglio-Bonda et al., 2010; Bertoldi et al., 2012). Dados da literatura sugerem existir uma frequência aumentada da deteção do EBV,CMV e HSV em várias formas de doença (Konstantinidis et al., 2005) tanto em tecido gengival como no fluido crevicular e placa subgengival (Cappuyns et al., 2005; Watanabe et al., 2007).

A frequência aumentada destes vírus em casos de doença funciona como argumento a favor da hipótese que correlaciona estes patógenos com a periodontite. Outros argumentos usados na defesa da hipótese estão relacionados com os mecanismos patogénicos dos próprios vírus e da sua interação com o hospedeiro. Os herpesvírus podem exercer o seu potencial periodontopático através de, pelo menos, 5 mecanismos distintos operando de forma isolada ou combinados: efeitos citopáticos diretos, diminuição das defesas imunes do hospedeiro, promoção da colonização de bactérias

periodontopatógenas, alterações nos mediadores inflamatórios e resposta das citocinas e, ainda, dano tecidular como resultado de respostas imunopatológicas a células infetadas com herpes vírus (Contreras & Slots, 2000).

Adicionalmente, os herpes vírus atraíram interesse devido à sua capacidade de causar infeções latentes que, periodicamente, sofrem reativação, e devido ao tropismo tecidular destas infeções virais que estão em consonância com o padrão mais comum de desenvolvimento da patologia periodontal (Slots et al., 2003) .

4. Evidência científica da relação dos herpesvírus com a doença periodontal

4.1 Detecção de herpes vírus em tecido gengival

O tecido gengival pode funcionar como um reservatório para alguns vírus da família *Herpesviridae* (Contreras et al., 2000). No estudo de Kato et al. (2013) foram detetadas grandes percentagens de células infetadas com EBV no tecido conjuntivo subjacente ao epitélio gengival (Kato et al., 2013) . No estudo de Contreras et al. (2000) foram detetadas grandes quantidades de herpesvírus (43% CMV e 79% EBV-1) em tecido gengival relativamente a amostras de bolsas periodontais embora a relação encontrada não seja estatisticamente significativa, facto este que pode advir da pequena amostra do estudo, 25 pacientes (Contreras et al., 2000). Kubar et al. (2005) observaram elevadas quantidades de CMV e EBV em tecido gengival assim como em amostras de placa subgengival principalmente no grupo com periodontite agressiva comparativamente a um grupo de periodontite crónica (Kubar et al., 2004) Os dados do estudo de Rotola et al. (2008) indicam existir um elevado tropismo do HHV-7 para os tecidos gengivais que podem ser considerados um potencial reservatório para este vírus (Rotola et al., 2008). Estes dados são consonantes com o estudo realizado pelo mesmo grupo de autores em 2003 onde também foi encontrada uma elevada prevalência de HHV-7, através de *Nested PCR*, em biópsias gengivais de pacientes saudáveis (70%) e com periodontite crónica (77%) (Cassai et al., 2003). É preciso notar que a mera presença de ADN viral não implica um papel etiológico do vírus, sublinhando que o HHV-7 estabelece infeções latentes na maioria dos indivíduos (Rotola et al., 2008).

4.2. Detecção de herpes vírus em fluido crevicular

Klemenc et al. (2005) observaram uma prevalência de 43% de EBV, 24% de HHV-6 e 3% de CMV nas amostras de fluido crevicular de pacientes com periodontite mas não encontraram quantidades detectáveis de herpes vírus em pacientes clinicamente saudáveis (Klemenc et al., 2005). Watanabe et al. (2007) observaram a existência de uma associação positiva entre EBV-1 no fluido crevicular e lesões periodontais de pacientes com periodontite agressiva, este vírus ocorreu com maior frequência em localizações periodontais comparativamente a localizações de gengivite (Watanabe et al., 2007). Grenier et al. (2009) encontraram no seu estudo pelo menos uma forma viral (CMV, EBV, HSV) em 45% dos pacientes com periodontite antagonicamente a prevalências mais baixas nos grupos com gengivite ou periodontalmente são (Grenier et al., 2009).

4.3. Detecção de herpes vírus na placa subgengival

Está reportado na literatura a deteção de herpesvírus na placa subgengival de pacientes com periodontite crónica (Wu et al., 2006; Wu et al., 2007), periodontite agressiva (Saygun et al., 2004), periodontite associada a VIH (Stein et al., 2013) e gengivite (Saygun et al., 2004). Alguns estudos relatam maior carga viral em localizações ativas de doença periodontal quando comparadas a localizações não-ativas (Stein et al., 2013)

Das et al. (2012) encontraram uma maior frequência de deteção de HSV-1 e EBV-1 em amostras subgengivais de pacientes tanto com periodontite crónica (76%) como periodontite agressiva (80%) comparativamente a um grupo controlo de pacientes periodontalmente saudáveis (12%). Relativamente ao HSV-2 não foi encontrada uma relação estatisticamente significativa (Sushma et al., 2012). Resultados semelhantes foram observados no estudo de Contreras e Slots (2001) onde o HSV-1 foi detetado em todas as amostras recolhidas mas, antagonicamente, o HSV-2 não foi detetado em nenhuma das amostras especulando-se que este vírus tem uma capacidade limitada ou é incapaz de infetar tecidos periodontais em alguns indivíduos como referido anteriormente (Contreras & Slots, 2001). Sabe-se que a infeção por HSV-1 vai encurtar a duração dos sintomas e diminuir a severidade das primoinfeções por HSV-2 logo, é provável que, indivíduos que adquiram o tipo 1 de HSV numa fase precoce da vida obtenham algum tipo de imunidade contra a infeção por HSV-2 no entanto esta hipótese

permanece ainda por testar (Contreras & Slots, 2001). No estudo de Saygun et al. (2004) também não foi encontrada uma associação estatisticamente significativa entre o HSV-2 e a forma agressiva da doença, dados estes de acordo com maior prevalência deste tipo viral em infeções ano-genitais (Saygun et al., 2004).

O estudo de Saygun et al. (2004) permitiu identificar os vírus CMV,EBV-1 e HSV-1 em aproximadamente 75% das amostras subgingivais de pacientes com periodontite agressiva e ausentes nos pacientes periodontalmente sãos suportando a ideia de que estes vírus contribuem na etiopatogénese da periodontite agressiva (Saygun et al., 2004).

Kubar et al. (2004), por outro lado, recolheram dados que indicam a participação do CMV na patogénese da periodontite agressiva; este vírus foi detetado em 68,8% das amostras subgingivais dos pacientes com periodontite mas em 0% dos pacientes periodontalmente sãos (Kubar et al., 2004).

Wu et al. (2006) detetaram com maior frequência a presença de EBV-1 em pacientes com periodontite crónica relativamente a pacientes com gengivite ou periodontalmente sãos encontrando, ainda uma correlação positiva com a hemorragia à sondagem (Wu et al., 2006). Moghim et al. (2007) também observaram uma frequência aumentada de EBV-1 nas amostras subgingivais de pacientes com periodontite crónica (60,7%) comparativamente ao grupo controlo (2,5%) (Moghim et al., 2007). As diferenças encontradas nos vários estudos que detetam a EBV em amostras de placa subgingival podem ter origem nas diferentes técnicas de deteção aplicadas, *status* periodontais dissemelhantes e a variações geográficas da prevalência deste vírus (Moghim et al., 2007). O estudo de Chalabi et al. (2010) utilizou uma população com periodontite crónica e o EBV-2 foi detetado com baixa frequência (10%) comparativamente ao EBV-1 (72,5%), o EBV-2 parece ter uma associação leve com a doença (Moghim et al., 2007) e é preferencialmente encontrado em casos de periodontite agressiva (Chalabi et al., 2010).

O estudo de Wu et al. (2007) representa a primeira descrição dos genótipos dominantes do CMV em amostras subgingivais de uma população com periodontite crónica chinesa. Foi observada uma relação estatisticamente significativa entre o genótipo II do gene gB do CMV e a Periodontite crónica, antagonicamente, o genótipo I foi associado a pacientes com gengivite e periodontalmente saudáveis. Parece, pois, que alguns genótipos são dominantes e relacionáveis com doença enquanto outros não demonstram patogenicidade. Neste estudo, tanto o EBV-1, EBV-2 como a coinfeção

dos vírus Epstein-Barr e CMV foram associados com a forma crónica de periodontite (Wu et al., 2007).

O estudo de Bilichodmath et al. (2009) detetou maiores quantidades de herpesvírus (HSV-1, HSV-2, EBV e CMV) em pacientes com periodontite crónica comparativamente a pacientes com periodontite agressiva, resultados antagónicos a outros estudos que podem ser explicados pela idade, etnia da população incluída, pequena amostra e a forma de PCR utilizada (*Multiplex*) (Bilichodmath et al., 2009).

É necessário ter em consideração que os herpes vírus podem estar combinados nas bolsas periodontais e atuar de forma sinérgica contra os tecidos do hospedeiro (Bilichodmath et al., 2009). Vários estudos detetaram coexistência de herpes vírus na placa subgingival: Bilichodmath et al. (2009) observaram maiores quantidades de EBV e de HSV-1 em situações de Periodontite crónica e agressiva, Kamma et al. (2001) detetaram maiores quantidades de CMV, EBV-1 e HSV em indivíduos com periodontite agressiva; Wu et al. (2007) observaram uma associação da coinfeção do EBV e CMV com a forma crónica de periodontite (Bilichodmath et al., 2009; Kamma et al., 2001; Wu et al., 2007)

Na última década venceu-se o suposto papel da dos herpesvírus na doença periodontal utilizando como argumentos a favor estudos que identificam estes vírus em amostras de placa subgingival e outras localizações de pacientes com periodontite e os comparam a pacientes saudáveis (Nibali et al., 2009; Foglio-Bonda et al., 2010; Stein et al., 2013), no entanto, os dados obtidos de pacientes saudáveis são retirados, normalmente, de um número relativamente pequeno de participantes (Foglio-Bonda et al., 2010). O estudo de Foglio-Bonda de 2010 detetou CMV em amostras subgingivais de num terço dos pacientes incluídos usando PCR. Este estudo inclui um número elevado de participantes (n=50), todos periodontalmente são, contrariando portanto achados de outros estudos (Foglio-Bonda et al., 2010).

A manutenção de um modelo para a periodontite com influência dos herpes vírus é desafiada por outros estudos que não confirmam uma prevalência aumentada em situações de periodontite crónica e agressiva ou que não encontraram diferenças da carga viral entre bolsas pouco profundas e bolsas profundas (Stein et al., 2013). No estudo de Nibali et al. (2009) não foi detetado CMV em nenhuma das amostras de pacientes com periodontite agressiva e somente em 6% foi detetado EBV (Nibali et al., 2009). Igualmente, o estudo de Stein et al. (2013) foram detetadas quantidades insignificantes de HSV-1, CMV e EBV em bolsas periodontais de 65 casos de

periodontite agressiva e de pacientes periodontalmente saudáveis, não foram encontradas diferenças significativas entre as prevalências de IgG e IgM contra estes vírus nos dois grupos estudados (Stein et al., 2013). Da mesma forma, Sunde et al. (2008) detectaram valores baixos, próximos dos limites de detecção, de EBV (40%) e CMV (12%) em amostras de placa subgengival de doentes periodontais, usando *Real-time* PCR (Sunde, Olsen, Enersen, Beiske, et al., 2008). Estes resultados estão de acordo com aqueles reportados por Klemenc (Klemenc et al., 2005)

Dawson et al. (2009) hipotetiza que o ADN viral presente na placa subgengival seja meramente consequência da sua presença na saliva. Os autores detetaram 81,5% de ADN de EBV na saliva de 65 pacientes com periodontite crónica e esta percentagem foi correlacionada com uma probabilidade 10 vezes maior de possuir EBV na placa subgengival do que os restantes pacientes onde foi detetado EBV. A presença deste vírus na saliva não se correlacionou, neste estudo, com a severidade da doença (Dawson et al., 2009). Saygun et al. (2005), por outro lado, observaram uma falta de correlação entre o EBV presente na saliva e placa subgengival mas encontraram uma correlação positiva entre a profundidade de sondagem e o ADN viral de EBV encontrado na saliva (Saygun et al., 2005). Os dados existentes, são, portanto, contraditórios.

4.4. Detecção de herpes vírus na saliva

Idesawa et al. (2004) detetaram com maior frequência EBV na saliva de pacientes periodontais relativamente ao grupo controlo, periodontalmente são. O *status* periodontal de um subgrupo de 11 pacientes analisado melhorou após tratamento periodontal inicial acompanhado por um decréscimo acentuado do EBV; este vírus poderá refletir o estado de inflamação periodontal existente, a inflamação dos tecidos periodontais, por seu turno, poderá ser responsável pela prevalência do EBV salivar (Idesawa et al., 2004). Dawson et al. (2009) observaram uma relação entre o EBV salivar e a placa subgengival, estes resultados podem ser consequência da comunicação entre os dois compartimentos antes ou durante as recolhas de amostras; uma interação ativa entre estas duas localizações poderia explicar os resultados de alguns estudos (Idesawa et al., 2004; Saygun et al., 2005) que observaram uma diminuição dos níveis salivares de EBV após tratamento periodontal inicial (Dawson et al., 2009).

Sugano et al. (2004), utilizando *Real-time* PCR, encontraram uma maior proporção de *P.gingivalis*, utilizando, na saliva de pacientes com periodontite e

positivos para o vírus EBV relativamente à saliva de pacientes negativos para o vírus mostrando existir uma possível associação entre o EBV e a bactéria (Sugano et al., 2004).

No estudo de Imbronito et al. (2008) a frequência de CMV é comparável entre os três tipos de amostras utilizados pelos autores- placa subgengival, saliva e sangue periférico- ao contrário da deteção de EBV-1. Poder-se-á utilizar uma combinação de amostras de saliva e placa subgengival para detetar o EBV-1, de modo a evitar falsos negativos provenientes de só um método de amostragem (Imbronito et al., 2008).

4.5 Associação entre a reativação viral com a periodontite

A reativação dos herpes vírus poderá constituir um evento particularmente relevante no desenvolvimento de doença periodontal (Slots, 2004), resultar numa supressão das defesas imunológicas dos tecidos periodontais, sobrecrecimento de microorganismos subgengivais (Watanabe et al., 2007; Escalona & Limonchy, 2009), maior libertação de citocinas e quimoquinas, iniciação de uma cascata de eventos citotóxicos e imunopatológicos que produzem destruição dos tecidos periodontais (Escalona & Limonchy, 2009).

O produto do gene BZLF1 do vírus EBV, ZEBRA, é um importante regulador da passagem de uma fase latente para um ciclo de replicação lítico viral (Sugano et al., 2004;Imai et al., 2012). Imai et al. (2012) observaram que a *P.gingivalis* induz a expressão da proteína ZEBRA, estes achados são importantes na medida em que sugerem que a doença periodontal funciona como fator de risco para a reativação do EBV em indivíduos infetados podendo, conseqüentemente, levar ao desenvolvimento de doenças relacionadas com este vírus (Imai et al., 2012).

4.6 Associação com a severidade da doença periodontal

Alguns estudos que quantificam a presença dos herpes vírus em bolsas periodontais procuraram encontrar uma associação positiva entre estes vírus e a severidade da patologia (Kamma et al., 2001). No estudo de Sushma et al. (2012) foi encontrada uma maior frequência de deteção de HSV-1 e EBV-1 em localizações com maior profundidade de sondagem e maiores perdas de inserção clínica e, neste contexto o HSV-1 poderá estar associado à severidade e progressão da doença (Das et al., 2012).

No estudo de Kamma et al. (2001) foi encontrada uma frequência significativamente mais elevada de herpesvírus- CMV,EBV-1 e HSV- e da sua co-infeção em localizações ativas de doença comparativamente a localizações estáveis ou sem progressão. A presença de profundidades de sondagem iguais ou superiores a 2 mm e hemorragia à sondagem foram utilizados como indicadores de doença periodontal (Kamma et al., 2001). Monzón et al. (2011) observaram a presença de HSV somente em 17% dos pacientes incluídos mas que em 60% dos casos corresponderam a graus severos de destruição periodontal utilizando como parâmetros a profundidade das bolsas, extensão da lesão e padrão de destruição óssea. Este estudo sugere que a infeção por herpes vírus pode estar relacionada de forma direta com o grau de destruição que afeta os tecidos de suporte dentário (Monzón et al., 2011).

Kato et al. (2013) detectaram maiores quantidades de ADN de EBV em bolsas profundas (≥ 5 mm) de pacientes com periodontite crónica comparativamente a bolsas pouco profundas (≤ 3 mm) e sulcos periodontais de pacientes saudáveis. Os autores colocaram a hipótese de uma relação entre a presença de EBV e uma maior profundidade de sondagem (Kato et al., 2013). No estudo de Chalabi et al (2008) também foi observada uma maior prevalência de EBV-1 em bolsas com profundidades de sondagem ≥ 6 mm comparativamente a bolsas ≤ 3 mm (Chalabi et al., 2008).

Wu et al. (2007) observaram uma percentagem elevada de hemorragia à sondagem foi observada em pacientes infetados com vírus CMV gB-II e EBV e em situações de coinfeção dos dois vírus, também foi avaliada uma maior profundidade de sondagem e perda de inserção clínica quando comparadas aos pacientes que não foram infetados com os dois vírus mencionados (Wu et al., 2007).

Clinicamente o CMV e o EBV podem ser correlacionados com o nível de inflamação gengival e a severidade da doença periodontal quando avaliada a profundidade da bolsa e a perda de inserção (Saygun et al., 2008).

Por outro lado, outros estudos falharam ao tentar encontrar uma conexão entre a presença de herpesvírus e a severidade da periodontite. Botero et al. (2008) não encontrou uma correlação entre um número elevado de cópias de CMV e o grau de destruição periodontal (Botero et al., 2008).

Não é surpreendente que nas bolsas periodontais mais profundas (nichos subgengivais da cavidade oral) esteja aumentada probabilidade de detetar herpesvírus principalmente usando métodos de deteção muito sensíveis. Assim, os resultados dos estudos apresentados podem não corresponder a um papel patogénico dos herpesvírus

vírus nas bolsas periodontais mas sim a uma maior quantidade de ADN viral em bolsas profundas “ativas”. Adicionalmente, nas lesões periodontais podem ser encontradas maiores quantidades de células imunocompetentes como neutrófilos e leucócitos que podem ser infetados por herpesvírus, assim, a deteção de ácidos nucleicos virais pode estar aumentada mas não conduz necessariamente a uma relação direta entre herpesvírus e periodontite (Stein et al., 2013).

4.7 Efeitos citotóxicos diretos

Os herpes vírus podem ter um efeito citopático direto sobre fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, células inflamatórias como leucócitos polimorfonucleados (PMN), linfócitos, macrófagos e possivelmente células ósseas que são elementos chave do tecido periodontal inflamado (Escalona & Limonchy, 2009; Bilichodmath et al., 2009; Slots, 2010b ; Slots et al., 2006). O efeito citopático direto pode, ainda alterar a reparação tecidual (Escalona & Limonchy, 2009)

4.8 Efeitos na resposta imunológica

Tanto a resposta imune inata como adaptativa têm uma função indispensável na prevenção da replicação e disseminação viral no hospedeiro. Sucintamente, uma infeção viral ativa enceta a ativação do fator nuclear kappa B e a sua translocação para o núcleo promovendo a expressão de citocinas pro-inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão nas células infetadas por vírus. As citocinas pro-inflamatórias recrutam macrófagos e células NK para o local da infeção e ativam a expressão celular de vários efectores. As células do sistema inato promovem a lise de células infetadas com vírus e são uma fonte de linfócitos T helper tipo 1, citocinas pro-inflamatórias antivirais incluindo as interleucinas 1,6, 12 e 18 assim como o fator de necrose tumoral e interferões. A ativação do sistema imune inato leva, por sua vez, à ativação do sistema imunitário adaptativo especialmente dos linfócitos T citotóxicos CD8+ (Escalona & Limonchy, 2009). Relativamente à alteração da resposta das citocinas sabe-se que tanto o EBV como o CMV levam a um aumento da expressão génica da IL-1 β e TNF- α de monócitos e macrófagos (Slots, 2010b); a IL-1 α e o TNF- α podem estimular as Metaloproteinases de Matriz (MMPs), diminuir a síntese de inibidores das MMPs e mediar a destruição óssea periodontal (Pérez et al., 2011; Escalona & Limonchy, 2009).

Evidentemente que os herpesvírus também são capazes de evadir às respostas imunes utilizando processos celulares e interferindo com as funções anti-virais do hospedeiro (Saygun et al., 2008). Entre estas estratégias destaca-se a destruição do MHC nos macrófagos dificultando a apresentação de antígenos, silenciamento das células NK, inibição de processos de apoptose e alteração das respostas das citocinas e dos seus receptores (Watanabe et al., 2007), restrição da atividade de linfócitos T, interação com fatores do complemento e modulação de sinais de transdução e atividade do fator de transcrição (Escalona & Limonchy, 2009).

As infeções ativas por herpes vírus podem deteriorar significativamente as células envolvidas na defesa periodontal permitindo não só um crescimento de patógenos periodontais como predispor a infeções secundárias através da geração de anticorpos contra os neutrófilos e, conseqüentemente, levando a neutropenia, anormalidades na adesão, quimiotaxia e fagocitose, alteração das propriedades oxidativas, secretórias e antibacterianas dos PMN (Escalona & Limonchy, 2009; Slots, 2010b). Podem, ainda, alterar as funções de monócitos, macrófagos e linfócitos (Escalona & Limonchy, 2009).

Os resultados de Ongeádi et al. (1987) corroboram estas possíveis alterações nos PMN conseqüentes da infeção viral observando uma diminuição da capacidade fagocítica e bactericida dos PMN em indivíduos portadores de herpesvírus (Ongeádi et al., 1987). Lin & Li (2009) observaram uma diminuição da capacidade de resposta dos macrófagos à ameaça bacteriana. Avaliaram a atividade de macrófagos pré infetados com CMV e EBV contra bactérias observando nos seus resultados uma diminuição da produção de TNF- α (tipicamente induzido por bactérias orais), inibição da atividade fagocítica de macrófagos e a regulação negativa do TLR-9 (cuja expressão promove a fagocitose), ou seja, estes vírus diminuem a capacidade de resposta dos macrófagos (Lin & Li, 2009). Botero et al. (2008) estudaram, *in vitro*, o efeito do citomegalovírus nos fibroblastos gengivais observando uma *upregulation* das MMPs I e II e uma redução progressiva da expressão de mRNA de colagénio I e III (0-72hora) (Botero et al., 2008b). Visto que o colagénio é um componente *major* dos tecidos periodontais, então é dedutível pensar que uma alteração nestes componentes da matriz possa levar a uma alteração direta dos tecidos periodontais nomeadamente através da formação de bolsas (Botero et al., 2008b).

4.8.1 Influência do CMV na resposta imunológica

O genoma viral do CMV codifica genes envolvidos na regulação da expressão de moléculas de HLA classe I (Das et al., 2012; Slots et al., 2003; Slots, 2005), no sequestro de quimocinas, na indução de recetores Fc e interferência com a indução de antigénios HLA classe II e pode inibir a atividade de células NK (Das et al., 2012; Slots et al., 2003) . Adicionalmente, pode limitar processos de apoptose e induzir anomalias na adesão, quimiotaxia, fagocitose, secreção oxidativa e atividades bactericidas dos PMN (Das et al., 2012; Lin & Li, 2009). Em adição, pode exercer o seu potencial periodontopático através da regulação *de* citocinas resorptivas como IL-1 β e TNF- α , elementos com capacidade de induzir ativamente a reabsorção óssea e destruição de tecido conjuntivo (Wara-Aswapati et al., 2003; Slots, 2005).

No seu conjunto, as alterações às funções imunes induzidas pelo CMV podem conduzir a um estado de imunossupressão ou contribuir para reações imunopatológicas no periodonto (Slots et al., 2003).

4.8.2 Influência do HSV na resposta imunológica

O HSV pode evadir as defesas imunes ao cobrir-se de IgG mediante recetores Fc e recetores do complemento e pode, também, disseminar-se de uma célula hospedeira para outra sem entrar no espaço extracelular onde contactaria com anticorpos humorais (Pérez et al., 2011).

4.8.3 Influência do EBV na resposta imunológica

O EBV é um potente ativador da proliferação policlonal de linfócitos B induzindo a sua proliferação e diferenciação (Pérez et al., 2011; Slots, 2010b). Tanto o aumento do nível de citocinas como a proliferação policlonal de células B são características associadas a uma progressão mais rápida de doença periodontal (Pérez et al., 2011; Escalona & Limonchy, 2009). Os linfócitos B infetados por EBV podem libertar estruturas virais antigénicas que levam a uma produção de anticorpos bloqueadores, formação de complexos imunes e ativação de células T supressoras (Escalona & Limonchy, 2009). Este vírus pode, ainda, infetar e alterar a atividade de PMN e linfócitos (Moghim et al., 2007). Os macrófagos infetados por EBV apresentam uma regulação negativa do TNF- α (estimulado pela presença bacteriana) e uma atividade fagocítica inibida (Lin & Li, 2009).

4.9 Relação com as bactérias periodontopatogénicas

Várias doenças humanas podem ter uma etiopatogenia combinada, viral e bacteriana, designadamente a gripe, sinusite recorrente e gastroenterites (Slots, 2010a). Os Herpes vírus foram relacionados, na literatura, com a ocorrência elevada dos seguintes patógenos periodontais: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Treponema denticola* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Slots et al., 2002; Escalona & Limonchy, 2009; Kamma et al., 2001; Wu et al., 2007). As infeções ativas por herpesvírus podem conduzir a um aumento subgingival de microorganismos periodontopáticos e amplificar a sua patogenicidade nomeadamente através da alteração da função dos PMN, linfócitos e macrófagos, por alterarem ou diminuírem as defesas imunes no periodonto (Slots et al., 2002; Moghim et al., 2007). Adicionalmente a regulação seletiva de citocinas pode romper a homeostasia imune e facilitar disrupção de barreiras epiteliais do periodonto auxiliando o acesso das bactérias periodontopáticas a tecidos mais profundos do periodonto, como o tecido conjuntivo, com a criação de locais adicionais de ligação a outras bactérias (Kamma et al., 2001; Moghim et al., 2007; Slots, 2009); as proteínas destes vírus expressas nas membranas de células eucariotas podem também atuar como novos locais de ligação para bactérias (Slots, 2010b).

Em termos particulares, o EBV pode levar a um aumento de bactérias periodontopatogénicas através da imunossupressão via interleucina-10, da ativação policlonal de linfócitos B e através da indução de anticorpos anti-neutrófilos (Sugano et al., 2004). O citomegalovírus pode aumentar a adesão da *A.actinomycetemcomitans* a células epiteliais de bolsas periodontais (Slots, 2010b).

Vários estudos procuraram esclarecer a relação existente entre bactérias periodontogénicas e herpes vírus. O estudo realizado por Slots et al. (2003) teve como objetivo examinar uma possível interação entre os vírus CMV, EBV-1 e HSV e a bactéria *P. gingivalis* observando uma associação positiva entre CMV, HSV e a bactéria analisada e concluindo que, em conjunto podem ser cofatores na etiologia ou na reincidência da doença. Não foi encontrada uma associação entre o EBV-1 e a *P. gingivalis*, no entanto os autores teorizam que este vírus terá um papel promocional na periodontite através de mecanismos que envolvam outras bactérias periodontopáticas que não a *P.gingivalis* (Slots et al., 2003; Wu et al., 2007).

No estudo de Chalabi et al (2010) foi encontrada uma associação estatisticamente significativa entre *P. gingivalis*, *T. forsythia*, EBV-1 e CMV e a periodontite crónica em pacientes iranianos. O estudo de Slots (2010) está de acordo com estes achados (Slots,2010a). A presença de *A.actinomycescomitans* não foi associada a herpesvírus em casos de periodontite crónica tal como reportado no estudo de Saygun et al. (2004). Neste estudo, por outro lado, foram observadas associações estatisticamente significativas entre os vírus CMV e HSV-1 e as bactérias *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* e *C. rectus* e entre EBV-1 e *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *C. rectus*. Este foi o primeiro estudo que reportou existir uma associação entre os herpesvírus periodontais e *C.rectus* (Saygun et al., 2004). O estudo realizado pelo mesmo grupo de autores em 2008 encontrou correlações positivas entre os vírus CMV e EBV e as bactérias *P. gingivalis*, *T. forsythia*; o CMV foi também correlacionado com *C. rectus* (Saygun et al., 2008). Slots et al. (2002) realizaram um estudo com o intuito de determinar uma possível relação entre os herpesvírus HSV,CMV e EBV-1 e a bactéria *Dialister pneumosintes*. Foram recolhidas quatro amostras de cada paciente incluído, duas de localizações estáveis e duas de localizações ativas/em progressão de doença; o CMV foi o único vírus a deter uma associação estatisticamente significativa com a *D.pneumosintes* e a ocorrência combinada do vírus e bactéria em questão parece estar associada com localizações ativas da doença periodontal (Slots et al., 2002). Os autores teorizam que o CMV pode levar a um crescimento elevado da *D.pneumosintes* subgingival ou que a bactéria poderá ativar o CMV latente ou ainda, como terceira opção poderá existir uma relação bidirecional e recíproca (Slots et al., 2002). Kamma et al. (2001) observaram mais frequentemente as bactérias *P.gingivalis* e *D.pneumosintes* em localizações infetadas com herpes vírus do que localizações em que não foram detetados vírus; discutem que será mais provável uma infeção por herpes vírus aumentar o risco de infeções bacterianas do que o oposto (Kamma et al., 2001). No estudo de Kato et al. (2013) foram detetadas grandes quantidades de células infetadas com EBV no tecido conjuntivo subjacente ao epitélio gengival (Kato et al., 2013). Os mesmos autores demonstraram que no sobrenadante de uma cultura de *P.gingivalis* contendo elevadas concentrações de ácido butírico, inibe a histona desacetilase e, assim, aumenta a acetilalção de histonas e a atividade transcrição do gene BZLF1 que codifica proteínas importantes para a transição do EBV da latência para o ciclo de replicação lítico. Estas observações sugerem que bactérias produtoras de ácido butírico têm o potencial de reativar a reativação do EBV na cavidade oral de indivíduos infetados

(Kato et al., 2013). Observaram, ainda, que a coexistência de ADN de EBV e de *P. gingivalis* era mais elevada em bolsas profundas dos pacientes com periodontite crónica incluídos. Estes resultados suportam a teoria de que a presença combinada EBV e bactérias periodontopatogénicas aumenta o risco de desenvolvimento de doença (Kato et al., 2013).

Inúmeros estudos apontam para uma interação bilateral entre herpes vírus e bactérias (Slots et al., 2003; Monzón et al., 2011) onde a reativação viral conduz à supressão das defesas do hospedeiro permitindo um sobre crescimento bacteriano e, por outro lado, as enzimas e outros produtos bacterianos indutores de inflamação têm o potencial de ativar os herpes vírus- conceito de ciclo vicioso (Slots et al., 2003; Slots, 2010b; Kamma & Slots, 2003). Adicionalmente, a presença de gengivite causada por bactérias têm o potencial de facilitar o aparecimento de células infetadas com herpesvírus para o tecido gengival (Monzón et al., 2011). É concebível que os herpes vírus dependam de uma infeção simultânea com bactérias putativas periodontais para produzir periodontite (Chalabi et al., 2010) e que, inversamente, as bactérias dependam da presença vírica para que se dê início à progressão de alguns tipos de periodontite (Monzón et al., 2011; Saygun et al., 2004). Anexamente, alguns mecanismos imunes ativos contra vírus podem diminuir as respostas imunes contra bactérias e vice-versa (Slots, 2010a).

5. Influência nas terapêuticas periodontais

O mecanismo direto ou indireto de destruição periodontal associada a herpesvírus pode potencialmente afetar os resultados dos tratamentos periodontais incluindo procedimentos de regeneração periodontal como observado no estudo de Bertoldi et al. (2012) onde a presença de HSV-1 (antes do procedimento cirúrgico) foi associada a piores resultados clínicos após um ano (nível de inserção clínica, profundidade de sondagem e recessão gengival) da terapia regenerativa (Bertoldi et al., 2012).

6. Modelo para a Periodontite associada a herpes vírus

Slots & Contreras, no ano 2000, descreveram um modelo para a doença periodontal humana relacionada à infeção por herpesvírus (Slots & Contreras, 2000;

Escalona & Limonchy, 2009; Cassai et al., 2003). Em suma, a ativação dos herpesvírus resulta na supressão das defesas imunes, crescimento de bactérias putativas periodontais, libertação de citocinas pró-inflamatórias e quimocinas, iniciação de eventos citotóxicos e imunopatológicos levando à destruição tecidual (Kamma et al., 2001; Wu et al., 2007; Rotola et al., 2008).

Inicialmente a inflamação gengival induzida por placa bacteriana induz a que células inflamatórias infetadas com herpesvírus entrem no tecido gengival nomeadamente macrófagos e LT periodontais que podem albergam herpesvírus latentes assim como LB que podem conter EBV também em estado de latência (Monzón et al., 2011; Watanabe et al., 2007). Subsequentemente pode ocorrer a reativação destes vírus no tecido gengival agravando a resposta inflamatória, acelerando a doença existente e expressando as propriedades periodontopatógenas dos herpesvírus (Monzón et al., 2011). A reativação viral diminui a resistência dos tecidos periodontais conduzindo a um aumento do número de bactérias patogénicas e à libertação de citocinas e quimoquinas dos macrófagos e outras células do hospedeiro provavelmente envolvendo também células do tecido conjuntivo da lesão periodontal. (Slots & Contreras, 2000; Monzón et al., 2011). Ao alcançar uma carga viral crítica os macrófagos e linfócitos que foram ativados podem desencadear um importante fluxo de citocinas, quimocinas, prostangladinas, interferões e outros mediadores plurifuncionais, alguns dos quais com grande potencial de reabsorção óssea (Monzón et al., 2011).

A reativação viral pode ocorrer de forma espontânea ou como resultado de condições que levam a uma debilitação do sistema imunitário (infeção por VIH, mudanças hormonais, *stress* psicossocial e físico). Os fatores que ativam os herpesvírus são reconhecidos, também, como fatores de risco para a doença periodontal (Monzón et al. 2011; Slots & Contreras, 2000; Watanabe et al., 2007; Slots, 2009). De facto, a razão de tantos eventos imunossupressores agravarem a doença podem dever-se, parcialmente, à ativação viral (ver ANEXO IV).

7. Discussão

A presença aumentada dos herpes vírus especialmente do CMV e EBV em casos de doença constitui um argumento a favor da hipótese que correlaciona estes vírus com a doença periodontal. Adicionalmente, os mecanismos patogénicos dos próprios vírus e

a sua interação com o hospedeiro constituem outros argumentos utilizados (Contreras & Slots, 2000).

Se for reconhecido que a periodontite é uma doença multifatorial envolvendo tanto bactérias como herpesvírus, interagindo com as defesas do hospedeiro, poder-se-ia explicar muitas características da doença periodontal como a sua relativa baixa incidência na maioria da população. Neste contexto, a destruição dos tecidos periodontais só ocorreria se a carga viral fosse adequada e capaz de induzir gengivite, se ocorresse ativação dos herpesvírus no periodonto, se proteção antiviral fosse inadequada por parte dos linfócitos T, se estivessem presentes bactérias periodontais específicas e a resposta anticorpos se mostrasse inadequada (Kamma & Slots, 2003; Monzón et al., 2011).

Alterações entre períodos de latência prolongados intercedidos por períodos de ativação dos herpesvírus podem ser parcialmente responsáveis pela progressão episódica da periodontite (Kamma & Slots, 2003; Saygun et al., 2004) e de situações de abscessos em pacientes periodontais (Sunde et al., 2008). O tropismo tecidular dos herpesvírus, por sua vez, pode ajudar a explicar o padrão localizado da destruição tecidular em doença (Kamma & Slots, 2003; Saygun et al., 2004). Uma reativação frequente destes vírus pode explicar a rápida destruição tecidular que alguns pacientes apresentam mesmo na presença de pouca placa bacteriana. A ausência de infecção viral ou da sua reativação pode clarificar porque é que alguns pacientes têm bactérias periodontopatógenas e mantêm a saúde periodontal (Kamma & Slots, 2003). O que se tem observado nos inúmeros trabalhos de investigação sobre esta temática é que a infecção periodontal com presença de herpes vírus explicaria, em parte, periodontites com desenvolvimento rápido (Monzón et al., 2011). A teoria mais razoável é que os vários patógenos da periodontite cooperam entre si com valor sinérgico destrutivo e de um modo relativamente infrequente principalmente em períodos em que as defesas do hospedeiro se encontram debilitadas (Monzón et al., 2011)

Outro fundamento utilizado a favor da hipótese baseia-se na evidência crescente do papel que determinados vírus possuem em patologias que se acreditavam ser unicamente de origem bacteriana incluindo otites médias e infeções do trato respiratório (Sunde et al., 2008).

Subsistem, no entanto, obstáculos no estabelecimento de uma relação herpesvírus/periodontite. Por um lado sabe-se que uma grande quantidade de vírus pode estar presente e replicar-se no hospedeiro sem que haja sintomatologia e, neste sentido,

deve-se ter cautela ao considerar a relevância clínica de uma associação entre vírus/patologia (Sunde et al., 2008). É ainda importante compreender que relacionar a carga viral com a severidade da doença não é sinónimo ou prova de casualidade (Saygun et al., 2008). De facto, os herpesvírus têm sido associados em vários estudos (Slots et al., 2003; Saygun et al., 2008) a bactérias patogénicas especialmente *P. gingivalis* e *T. forsythia* logo, o verdadeiro papel dos herpesvírus na doença pode ser o de desequilibrar a relação imunidade/bactérias, por outras palavras, a periodontite pode ser resultado de respostas imunes alteradas a uma infeção combinada (Saygun et al., 2008). Outra explicação possível será admitir que não é a reativação viral que é causa de periodontite mas que o contrário sucede, ou seja, a doença periodontal causada por infeção bacteriana pode despoletar a reativação viral (Escalona & Limonchy, 2009; Pérez et al., 2011).

Um dos maiores desafios na confirmação ou na refutação da conexão dos herpes vírus na periodontite está na natureza ubíqua destes vírus e na ocorrência relativamente rara dos mesmos nas formas de doença periodontal progressiva (Slots et al., 2003; Monzón et al., 2011). Outra das dificuldades está relacionada com a recolha de amostras em localizações periodontalmente comprometidas, em bolsas profundas e com hemorragia à sondagem onde se pode recolher maior quantidade de fluido crevicular e, consequentemente, as amostras recolhidas poderão conter maior quantidade de células comparativamente à microflora subgingival (Pérez et al., 2011; Escalona & Limonchy, 2009; Dawson et al., 2009). Ou seja, as amostras recolhidas de localizações periodontalmente comprometidas são mais propensas a conter vírus provenientes do sangue independentemente de uma associação específica com o processo patológico da doença (Escalona & Limonchy, 2009).

Os estudos clínicos incluídos possuem limitações, em primeiro lugar, a maioria dos estudos que analisam uma conexão entre os herpes vírus e a doença periodontal foram realizados pelo mesmo grupo de investigação ou em colaboração com esses autores e as amostras desses estudos são analisadas no mesmo laboratório (Escalona & Limonchy, 2009). Adicionalmente, 13 dos estudos incluídos fizeram uma análise microbiológica *Nested* PCR (Cassai et al., 2003; Chalabi et al., 2008; Rotola et al., 2008; Botero et al., 2008; Contreras et al., 2000; Wu et al., 2006; Wu et al., 2007; Moghim et al., 2007; Kamma et al., 2001; Kato et al., 2013; Slots et al., 2002; Slots et al., 2003; Grenier et al., 2009) (ver ANEXO V) que, embora altamente sensível e específico é muito susceptível a contaminação e a gerar falsos positivos (Escalona &

Limonchy, 2009; Stein et al., 2013). A utilização de PCR quantitativo em tempo real pode ser um método mais apropriado e que não permite só a deteção do vírus mas também a sua quantificação (Burkardt, 2000). Esta informação foi corroborada pelo estudo de Botero (2008) onde a deteção de CMV foi superior usando *Nested* PCR do que *Real-time* PCR (Botero et al., 2008). É preciso, também analisar que o PCR poderá mostrar a presença viral em pacientes com infeções assintomáticas que nunca irão progredir para doença. Deste modo, é importante quantificar as cargas virais existentes de modo a poder diferenciar cargas clinicamente significativas *versus* cargas latentes (Kubar et al., 2004).

As populações utilizadas nos estudos mostram um amplo intervalo de idades e estado socioeconómico desconhecido o que constitui uma limitação na comparação de diferentes grupos (Escalona & Limonchy, 2009). Na verdade, as discrepâncias observadas relativamente aos dados na literatura dos estudos clínicos podem ser, em parte, consequência das diferentes populações estudadas pois a maioria dos estudos foram realizados em populações da América do Sul, China, Turquia ou Afro-americanos e, contrariamente, são escassos estudos em Caucasianos (Nibali et al., 2009; Stein et al., 2013); em diferentes populações podem-se realizar diferentes associações, logo os resultados deveriam ser diferenciados (Stein et al. 2013).

Embora a grande maioria dos estudos sugira um papel periodontopático destes vírus, a importância destes achados pode estar limitada ao facto da grande maioria dos estudos analisarem amostras retiradas de localizações periodontalmente afetadas sem um grupo controlo de indivíduos periodontalmente sãos (Combs et al., 2008) como os estudos de Bilichodmath et al. (2009), Contreras et al. (2000), Dawson et al. (2009), Watanabe et al. (2007), Contreras & Slots. (2001), Kamma et al. (2001), Monzón et al. (2011), Slots et al. (2002) e Slots et al. (2003), Sugano et al. (2004) e Kubar et al. (2005) (consultar ANEXO V).

Nos estudos incluídos existe uma grande amplitude das amostras recolhidas e do número de pacientes incluídos, alguns deles com número baixo de pacientes incluídos, inferior a trinta como o estudo de Slots et al. (2003), Slots et al. (2002), Kamma et al. (2001), Das et al. (2012), Contreras & Slots (2001), Contreras et al. (2000), Cassai et al. (2003) e Kubar et al. (2005) dificultando a toma de inferências (ver ANEXO V).

Existe uma grande disparidade, entre os estudos clínicos incluídos, dos critérios utilizados para classificar o tipo de doença periodontal. Watanabe et al. (2007), por exemplo, inclui pacientes com periodontite agressiva segundo os critérios de Tonetti

Mombelli (1999) e abrangeu pacientes com idades superiores a 35 anos de idade (Watanabe et al., 2007). Por outro lado, Stein et al. (2013) só incluíram pacientes com evidência de que o início da doença se tenha dado antes da idade de 35 (Stein et al., 2013); Kubar et al. (2004) só incluíram pacientes com idades inferiores a 35 anos (Kubar et al., 2004). Sugano et al. (2004), Grenier et al. (2009) e Klemenc et al. (2005), por sua vez, incluem pacientes com doença periodontal mas não especificam a forma de periodontite. Sunde et al. (2008) utilizaram a denominação de periodontite “refractária”, denominação atualmente em desuso; Kamma & Slots. (2001) utilizam o termo “early-onset periodontitis” para designar periodontite agressiva, termo já não utilizado atualmente.

Os ensaios clínicos analisados apresentam, também, disparidades nos milímetros e dentes utilizados na determinação de perdas de inserção clínicas, número de amostras recolhidas e forma de recolha das mesmas. Relativamente à recolha das amostras, os meios utilizados variam entre a utilização de curetas esterilizadas e, na superioridade dos casos, cones de papel. Na grande maioria dos estudos que utiliza cones de papel como meio de recolha de amostras, o tempo de permanência destes dentro da bolsa é de 30 segundos, como por exemplo observado no estudo de Kato et al. (2013), diferencialmente, no estudo de Kamma & Slots (2001) os cones de papel foram introduzidos apenas 20 segundos dentro da bolsa.

Os resultados dos estudos clínicos podem ser de difícil interpretação devido a falta de homogeneidade em determinadas definições e protocolos. Alguns investigadores utilizam termos como periodonto saudável ou normal inextinguivelmente para designar a ausência de perda de inserção clínica e de inflamação gengival. No entanto, a denominação de gengiva saudável pode ser usada noutros estudos para localizações com perdas de inserção clínica mas que possuem bolsas estreitas ou pouco profundas e sem inflamação. A definição periodonto “normal” pode ser aplicável a localizações sem perdas de inserção mas com algum grau de inflamação (Slots, 2010b)

Um agente etiológico aumenta a sua quantidade, tipicamente, durante fases avançadas de doença e pode estar presente em pequenas quantidades ou mesmo ausente em fases de remissão de doença logo, estudos que incidem as suas observações sobre os herpes vírus periodontais enfrentam a difícil tarefa de identificar as localizações ativas e localizações estáveis de doença (Slots, 2010b).

Visto que o tratamento periodontal reduz os níveis subgengivais de herpesvírus para valores indetetáveis ou próximos do limite de deteção durante um determinado

período de tempo, os estudos não deveriam incluir, idealmente, indivíduos com história de tratamento periodontal (Slots, 2010b). A maioria dos estudos clínicos incluídos cumpre este requisito, os estudos de Idesawa et al. (2004), Kamma & Slots (2001) e Kubar et al. (2005), no entanto, analisam os parâmetros clínicos dos pacientes após a realização de tratamento periodontal; no estudo de Watanabe et al. (2007) só 19 dos 30 pacientes incluídos não tinham sido sujeitos a algum tipo de tratamento periodontal antes da recolha de amostras. A maioria dos estudos só inclui pacientes que não tenham realizado terapêutica antibiótica num período pelo menos 6 meses antes do estudo, Stein et al. (2013), contrariamente, utiliza um período de 3 meses (Stein et al., 2013).

Possivelmente, a prova definitiva de um papel causal dos herpes vírus na doença periodontal humana terá que esperar pelo desenvolvimento de uma vacina efetiva contra este grupo de patógenos (Slots et al., 2003; Kamma & Slots, 2003) e o possível desenvolvimento de vacinas anti-herpesvírus constitui um tópico de grande interesse para o futuro da investigação (Slots, 2005). Sob este ponto de vista, Sunde et al. (2008) afirmam que o tratamento antiviral parece ser a melhor forma de clarificar o papel real do EBV na doença periodontal. Administraram terapia antiviral (Valtrex® durante 10 dias) a um paciente com doença periodontal recorrente e com elevadas quantidades de EBV subgingivais detetadas por PCR observando uma diminuição do vírus para níveis no limite de deteção e concomitantemente uma melhoria dramática da condição periodontal; um ano após o tratamento os parâmetros observados mantiveram-se estáveis. Este caso sugere que a deteção viral e subsequente terapia antiviral poderá ser útil como tratamento periodontal coadjuvante (Sunde et al., 2008) No futuro, a abordagem da doença periodontal poderá beneficiar de imunoterapias anti-herpesvirais ou através de vacinas profiláticas ou por meio de vacinas terapêuticas que estimulem o sistema imunitário no combate aos vírus presentes (Saygun et al., 2008).

A pesquisa da relevância dos herpes vírus na doença periodontal encontra-se, ainda, numa fase preliminar. De acordo com Kamma & Slots (2003) são necessários estudos que: 1) identifiquem as localizações orais onde estes vírus permanecem latentes; 2) caracterizem a expressão génica viral durante a latência; 3) identifiquem os alvos de infeção ativa por herpes vírus e o efeito destes patógenos nas células infetadas do periodonto; 4) determinem se é a replicação viral, as defesas imunes ou efeitos diretos dos vírus nas células imunes que funcionam como determinantes da periodontite; 5) definam componentes do sistema imunológico que têm um papel crítico na manutenção da latência dos herpesvírus no periodonto; 6) esclareçam os mecanismos através dos

quais os herpesvírus podem aumentar a virulência de bactérias periodontopáticas; 7) utilizem formas quantitativas de PCR (Moghim et al., 2007).

São necessários, também, mais estudos que comparem a frequência de herpes vírus em localizações ativas *versus* localizações estáveis de doença (Kamma et al., 2001).

8. Conclusões

Analisando a literatura existente não é possível apontar com certeza objetiva a existência de uma associação entre os herpesvírus e a etiopatogenia da doença periodontal.

Pela observação dos aspetos analisados é possível reconhecer que os herpesvírus EBV,CMV e HSV são detetados com elevada frequência em amostras de placa subgingival, fluido crevicular e saliva, utilizando métodos de PCR. É possível afirmar com elevada evidência que os herpesvírus possuem mecanismos patogénicos e citotóxicos influenciando negativamente as defesas imunológicas do hospedeiro.

Em termos teóricos pode ser inferido que infeções ativas por herpesvírus levam ao aumento do número de bactérias periodontopáticas e à ampliação da sua patogenicidade; os estudos clínicos focados nesta temática são heterogéneos nos seus achados não permitindo afirmar com veemência a existência de tal conexão.

Não é exequível, com base na literatura existente, assumir uma relação direta entre a presença de herpesvírus em bolsas periodontais e os parâmetros severidade e atividade da doença periodontal.

A dificuldade de extrair inferências prende-se com a heterogeneidade e limitações presentes na literatura existente sobre a temática: população incluída, dados demográficos, parâmetros avaliados dissemelhantes, distintas formas de deteção e ausência de grupos controlo. São necessários mais estudos com protocolos homogéneos entre si. Uma relação temporal entre os herpes vírus periodontais, manifestações clínicas de periodontite e o estabelecimento destes vírus como causa de doença vai requerer estudos longitudinais que detetem a presença viral no periodonto antes da iniciação da doença e que demonstrem que ao erradicar a infeção viral a progressão da doença é travada ou prevenida. Dado o exposto, de modo a provar, uma conexão entre herpesvírus e doença periodontal, será necessário desenvolver uma vacina efetiva contra este grupo de patógenos.

Referências Bibliográficas

1. Ambili R, Preeja C, Archana V, Nisha KJ, Seba A, Reejamol MK. Viruses: are they really culprits for periodontal disease? A critical review. *Journal of investigative and clinical dentistry*. 2014; 5(3):179–87.
2. Armitage G. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999; 4: 1-6.
3. Armitage G. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontology 2000*. 2004; 34:9–21.
4. Armitage G, Cullinan M. Comparison of the clinical features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontology 2000*. 2010; 53(63):12–27.
5. Bertoldi C, Pellacani C, Lalla M, Consolo U, Pinti M, Cortellini P, Cossarizza A. Herpes Simples virus impairs regenerative outcomes of periodontal regenerative therapy in intrabony defects. A pilot study. *Journal of Clinical Periodontology*. 2012; 39(4):385–392.
6. Bilichodmath S, Mangalekar SB, Sharma DCG, Prabhakar AK, Reddy SB, Kalburgi NB, et al. Herpesviruses in chronic and aggressive periodontitis patients in an Indian population. *J Oral Sci*. 2009;51(1):79–86.
7. Botero JE, Vidal C, Contreras a., Parra B. Comparison of nested polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR and viral culture for the detection of cytomegalovirus in subgingival samples. *Oral Microbiol Immunol*. 2008; 23(3):239–44.
8. Botero JE, Contreras A, Parra B. Effects of cytomegalovirus infection on the mRNA expression of collagens and matrix metalloproteinases in gingival fibroblasts. *J Periodontal Res*. 2008; 43(6):649–57.
9. Burkardt HJ. Standardization and quality control of PCR analyses. *Clin Chem Lab Med*. 2000;38(2):87–91.
10. Cappuyns I, Gugerli P, Mombelli A. Viruses in periodontal disease - a review. *Oral Dis*. 2005;11(4):219–29.
11. Cassai E, Galvan M, Trombelli L, Rotola A. HHV-6, HHV-7, HHV-8 in gingival biopsies from chronic adult periodontitis patients. A case-control study. *J Clin Periodontol*. 2003; 30(3):184–91.
12. Chalabi M, Moghim S, Mogharehabet A, Najafi F, Rezaie F. EBV and CMV in chronic periodontitis: a prevalence study. *Archives of virology*. 2008; 153(10): 1917–9.

13. Chalabi M, Rezaie F, Moghim S, Mogharehabet A, Rezaei M, Mehraban B. Periodontopathic bacteria and herpesviruses in chronic periodontitis. *Mol Oral Microbiol.* 2010; 25(3):236–40.
14. Chapple ILC, Van der Weijden F, Dorfer C, Herrera D, Shapira L, Polak D, et al. Primary prevention of periodontitis: managing gingivitis. *J Clin Periodontol.* 2015; 42 (16):71-76.
15. Combs DR, Reilly EA, Dawson DR, Avdiushko SA, Danaher RJ, Miller CS. Detection of human cytomegalovirus in dental plaque from individual periodontal sites by real-time polymerase chain reaction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* Mosby, Inc.; 2008; 106(6):840–4.
16. Contreras A, Nowzari H, Slots J. Herpesviruses in periodontal pocket and gingival tissue specimens. *Oral Microbiol Immunol.* 2000; 15:15–8.
17. Contreras A, Slots J. Typing of herpes simplex virus from human periodontium. *Oral Microbiol Immunol.* 2001;16(1):63–4.
18. Contreras A, Nowzari H, Slots J. Herpesviruses in periodontal pocket and gingival tissue specimens. *Oral Microbiol Immunol.* 2000;15:15–8.
19. Das S, Krithiga GSP, Gopalakrishnan S. Detection of human herpes viruses in patients with chronic and aggressive periodontitis and relationship between viruses and clinical parameters. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP.* 2012;16(2):203-209.
20. Dawson DR, Wang C, Danaher RJ, Lin Y, Kryscio RJ, Jacob RJ, et al. Salivary levels of Epstein-Barr virus DNA correlate with subgingival levels, not severity of periodontitis. *Oral Dis.* 2009;15(8):554–9.
21. Drisko CH. Nonsurgical periodontal therapy. *Periodontol 2000.* 2001; 25(1):77–88.
22. Echeverría A, Vignoletti F, Fabrizi S, Matesanz P. Papel etiológico de los virus en la enfermedad periodontal. *Av en Periodoncia e Implantol Oral.* 2007;19(2):91–100.
23. Escalona L, Limonchy M. Asociación de virus epstein barr con la enfermedad Periodontal. *Acta Odontológica Venez.* 2009;47(3):1–10.
24. Escudero-Castaño N, Perea-García M A, Bascones-Martínez A. Revisión de la periodontitis crónica: Evolución y su aplicación clínica. *Av en Periodoncia e Implantol Oral.* 2008;20(1):27–37.
25. Farias CG, Vinagre NP de L, Amanajás, Thalita de Almeida Laurentino RV, Machado, Luiz Fernando Almeida, Amoras-Alves ACB. Investigaçãõ do vírus Epstein-Barr em pacientes. *Rev Odontol da UNESP .* 2013;42(2):124–9.
26. Gustavo PG, Aranha AMF, Elcia MS, Vieira AE, Queiroz-Junior CM, Madeira Mila FM, et al. The Role of Chemokines and Cytokines in the Pathogenesis of

- Periodontal and Periapical Lesions: Current Concepts. In Mahin K .Inflammation, Chronic Diseases and Cancer - Cell and Molecular Biology, Immunology and Clinical Bases. InTech. 2012; 220-264.
27. Foglio-Bonda P, Gabriele M, Graziani F, De Andrea M, Mondini M, Gariglio M. High prevalence of human cytomegalovirus in a population of periodontally healthy subjects. *Med Oral Patol Oral y Cir Bucal*. 2010;15(2):e292–6.
 28. Grenier G, Gagnon G, Grenier D. Detection of herpetic viruses in gingival crevicular fluid of patients suffering from periodontal diseases: prevalence and effect of treatment. *Oral Microbiol Immunol*. 2009 Dec; 24(6):506–9.
 29. Hung S-L, Chiang H-H, Wu C-Y, Hsu M-J, Chen Y-T. Effects of herpes simplex virus type 1 infection on immune functions of human neutrophils. *J Periodontal Res*. 2012;47(5):635–44.
 30. Idesawa M, Sugano N, Ikeda K, Oshikawa M, Takane M, Seki K, et al. Detection of Epstein – Barr virus in saliva by real-time PCR. 2004 ;(16):230–2.
 31. Imai K, Inoue H, Tamura M, Cueno ME, Inoue H, Takeichi O, et al. The periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* induces the Epstein-Barr virus lytic switch transactivator ZEBRA by histone modification. *Biochimie*. Elsevier Masson SAS; 2012; 94(3):839–46.
 32. Imbronito A V, Grande SR, Freitas NM De, Okuda O, Lotufo RFM, Nunes FD. Detection of Epstein-Barr virus and human cytomegalovirus in blood and oral samples: comparison of three sampling methods. *J Oral Sci*. 2008;50(1):25–31.
 33. Kamma JJ, Contreras A, Slots J. Herpes viruses and periodontopathic bacteria in early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2001;28(9):879–85.
 34. Kamma JJ, Slots J. Herpesviral-bacterial interactions in aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2003 May; 30(5):420–6.
 35. Kato A, Imai K, Ochiai K, Ogata Y. Higher Prevalence of Epstein-Barr Virus DNA in Deeper Periodontal Pockets of Chronic Periodontitis in Japanese Patients. *PLoS One*. 2013;8(8):1– 5.
 36. Klemenc P, Skaleric U, Artnik B, Nogrsek P, Marin J. Prevalence of some herpesviruses in gingival crevicular fluid. *J Clin Virol*. 2005; 34(2):147–52.
 37. Konstantinidis A, Sakellari D, Papa A, Antoniadis A. Real-time polymerase chain reaction quantification of Epstein--Barr virus in chronic periodontitis patients. *J Periodontal Res*. 2005; 40(4):294–8.
 38. Kubar A, Saygun I, Özdemir A, Yapar M, Slots J. Real-time polymerase chain reaction quantification of human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in periodontal pockets and the adjacent gingiva of periodontitis lesions. *J Periodontal Res*. 2005; 40(2):97–104.

39. Kukhanova MK, Korovina AN, Kochetkov SN. Human Herpes Simplex Virus : Life Cycle and Development of Inhibitors. *Biochemistry (Moscow)*.2014; 79(13): 1635-1652.
40. Ledder RG, Gilbert P, Huws SA, Aarons L, Ashley MP, Hull PS, et al. Molecular analysis of the subgingival microbiota in health and disease. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(2):516–23.
41. Lin YL, Li M. Human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus inhibit oral bacteria-induced macrophage activation and phagocytosis. *Oral microbiology and immunology*. 2009; 24(3):243–8.
42. Moghim SH, Chalabi M, Abed AM, Rezaei F, Tamizifar H. Prevalence of Epstein-Barr virus type 1 in patients with chronic periodontitis by nested-PCR. *Pak J Biol Sci*. 2007; 10 (24): 4547-4550.
43. Monzón J, Acuña M, Canga E, Ortega S. Prevalencia de Herpes virus en bolsas periodontales de pacientes asistidos en la Cátedra de. *Rev la Fund Juan José Carraro*. 2011;34: 36-43.
44. Slots J, Sugar C, Kamma JJ. Cytomegalovirus periodontal presence is associated with subgingival *Dialister pneumosintes* and alveolar bone loss. *Oral Microbiol Immunol*. 2002;17(6):369–74.
45. Nibali L, Atkinson C, Griffiths P, Darbar U, Rakmanee T, Suvan J, et al. Low prevalence of subgingival viruses in periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 2009; 36(11):928–32.
46. Offenbacher S, Barros SP, Beck JD. Rethinking periodontal inflammation. *Journal of periodontology*. 2008; 79(8):1577–84.
47. Ongeádi J, Sallay K, Kulcsár G. The decreased antibacterial activity of oral polymorphonuclear leukocytes coincides with the occurrence of virus-carrying oral lymphocytes and epithelial cells. *Folia Microbiologica*. 1987;32(5):438–447.
48. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*. 1997;14:9–11.
49. Pérez CD, Castillo A, Castillo. Papel de los herpes virus en la enfermedad periodontal . Revisión de literatura Role of herpes virus in the periodontal disease . Consultation of literature. *Rev Habanera Ciencias Médicas*. 2011;10(4):458–64.
50. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet*. 2005 Nov 19;366(9499):1809–20.
51. Rao SM, Vanaki B, Ugale GM. Herpesvirus : A Periodontal Peril. *Int J Dent Updat*. 2012;2(2):83–92.

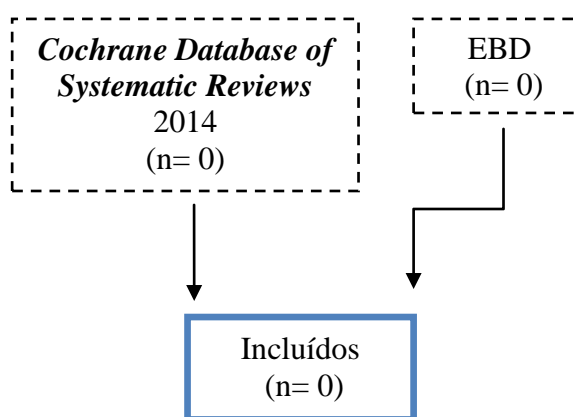
52. Riep B, Edesi-Neuß L, Claessen F, Skarabis H, Ehmke B, Flemmig TF, et al. Are putative periodontal pathogens reliable diagnostic markers? *J Clin Microbiol.* 2009;47(6):1705–11.
53. Rotola A, Cassai E, Farina R, Caselli E, Gentili V, Lazzarotto T, et al. Human herpesvirus 7, Epstein-Barr virus and human cytomegalovirus in periodontal tissues of periodontally diseased and healthy subjects. *J Clin Periodontol.* 2008 Oct; 35(10):831–7.
54. Saygun I, Kubar A, Ozdemir A, Yapar M, Slots J. Herpesviral-bacterial interrelationships in aggressive periodontitis. *J Periodontal Res.* 2004; 39(4):207–12.
55. Saygun I, Kubar A, Sahin S, Sener K, Slots J. Quantitative analysis of association between herpesviruses and bacterial pathogens in periodontitis. *J Periodontal Res.* 2008 J;43(3):352–9.
56. Saygun I, Kubar A, Sahin S, Sener K, Slots J. Quantitative analysis of association between herpesviruses and bacterial pathogens in periodontitis. *J Periodontal Res.* 2008;43(3):352–9. 57.
58. Slots J, Saygun I, Sabeti M, Kubar A. Epstein-Barr virus in oral diseases. *J Periodontal Res.* 2006;41(4):235–44.
59. Slots J. Herpesviral – bacterial interactions in periodontal diseases. *Periodontology* 2000. 2010;52(123):117–40.
60. Slots J. Herpesviruses in periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 2005;38:33–62.
61. Slots J. Human viruses in periodontitis. *Periodontol* 2000. 2010 Jun; 53:89–110.
62. Slots J. Oral viral infections of adults. *Periodontol* 2000. 2009;49:60–86.
63. Slots J. Update on human cytomegalovirus in destructive periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol.* 2004;19(4):217–23.
64. Slots J, Contreras A. Herpesviruses : a unifying causative factor in periodontitis ? *Oral Microbiol Immunol.* 2000;15:277–80.
65. Slots J, Kamma JJ, Sugar C. The herpesvirus- Porphyromonas gingivalis - periodontitis axis. *J Periodontal Res.* 2003 Jun;38(3):318–23.
66. Slots J, Slots H. Bacterial and viral pathogens in saliva: Disease relationship and infectious risk. *Periodontol* 2000. 2011;55(1):48–69.
67. Slots J, Sugar C, Kamma JJ. Cytomegalovirus periodontal presence is associated with subgingival Dialister pneumosintes and alveolar bone loss. *Oral Microbiol Immunol.* 2002;17(6):369–74.

68. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000. 2005; 38:135–187.
69. Stein JM, Said Yekta S, Kleines M, Ok D, Kasaj A, Reichert S, et al. Failure to detect an association between aggressive periodontitis and the prevalence of herpesviruses. *J Clin Periodontol*. 2013;40(1):1–7.
70. Sugano N, Ikeda K, Oshikawa M, Idesawa M, Tanaka H, Sato S, et al. Relationship between *Porphyromonas gingivalis*, Epstein-Barr virus infection and reactivation in periodontitis. *J Oral Sci*. 2004;46(4):203–6.
71. Sunde PT, Olsen I, Enersen M, Grinde B. Patient with severe periodontitis and subgingival Epstein-Barr virus treated with antiviral therapy. *J Clin Virol*. 2008;42(2):176–8.
72. Timmerman MF, van der Weijden GA. Risk factors for periodontitis. *Int J Dent Hyg*. 2006;4(1):2–7.
73. Tonetti MS, Eickholz P, Loos BG, Papapanou P, van der Velden U, Armitage G, et al. Principles in Prevention of Periodontal Diseases. *J Clin Periodontol*. 2015;42:5-11.
74. Wara-Aswapati N, Boch JÁ, Auron PE. Activation of interleukin 1beta gene transcription by human cytomegalovirus: molecular mechanisms and relevance to periodontitis. *Oral microbiology and immunology*. 2003; 18(2):67–71.
75. Watanabe SA, Campolina M, Horta R, Gomez RS. EBV-1 and HCMV in aggressive periodontitis in Brazilian patients EBV-1 e HCMV na periodontite agressiva em pacientes brasileiros. *Braz Oral Res*. 2007;21(4):336–41.
76. Bartold PM, Van Dyke TE. Periodontitis : a host-mediated disruption of microbial homeostasis . *Unlearning learned concepts*. *Periodontology* 2000.2013; 62:203–217.
77. Wu Y, Yan J, Chen L, Sun W, Gu Z. Infection frequency of Epstein-Barr virus in subgingival samples from patients with different periodontal status and its correlation with clinical parameters. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2006;7(11):876–83.
78. Wu Y-M, Yan J, Ojcius DM, Chen L-L, Gu Z-Y, Pan J-P. Correlation between infections with different genotypes of human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in subgingival samples and periodontal status of patients. *J Clin Microbiol*. 2007;45(11):3665–70.

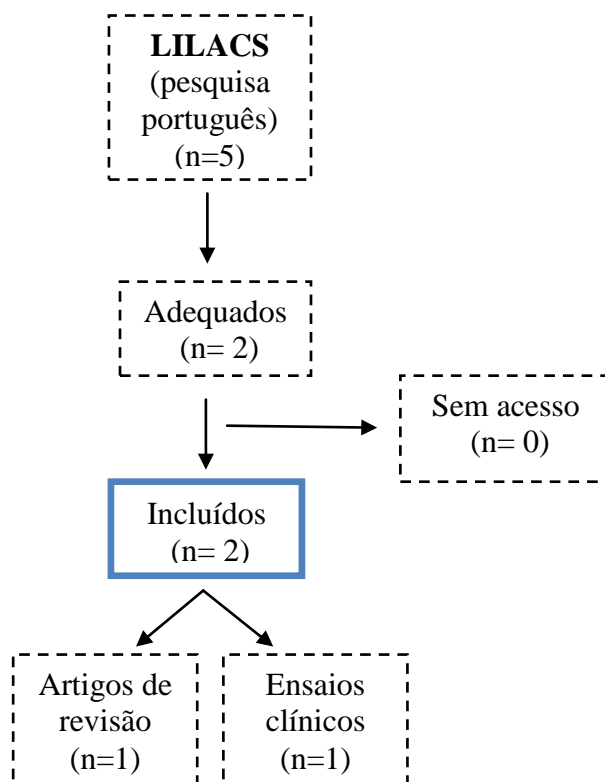
Anexos

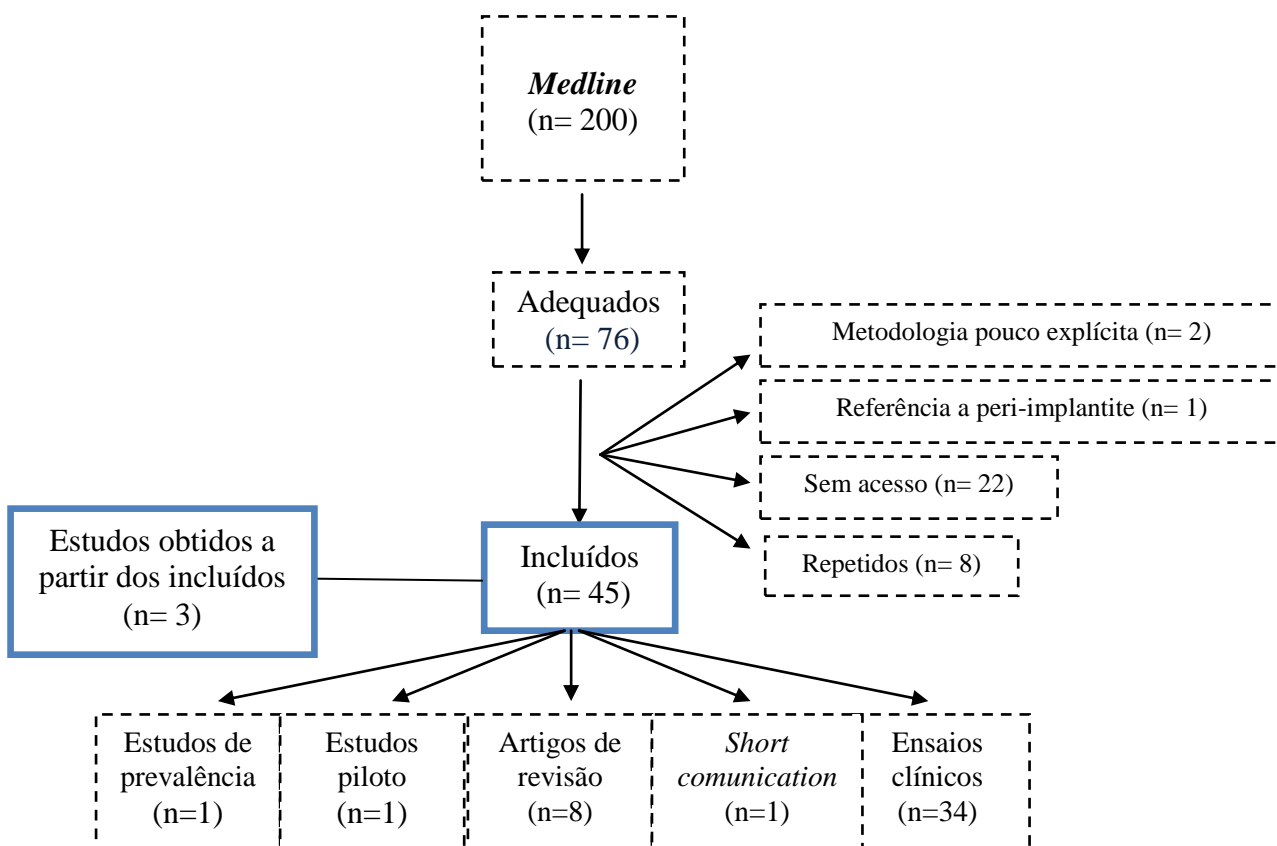
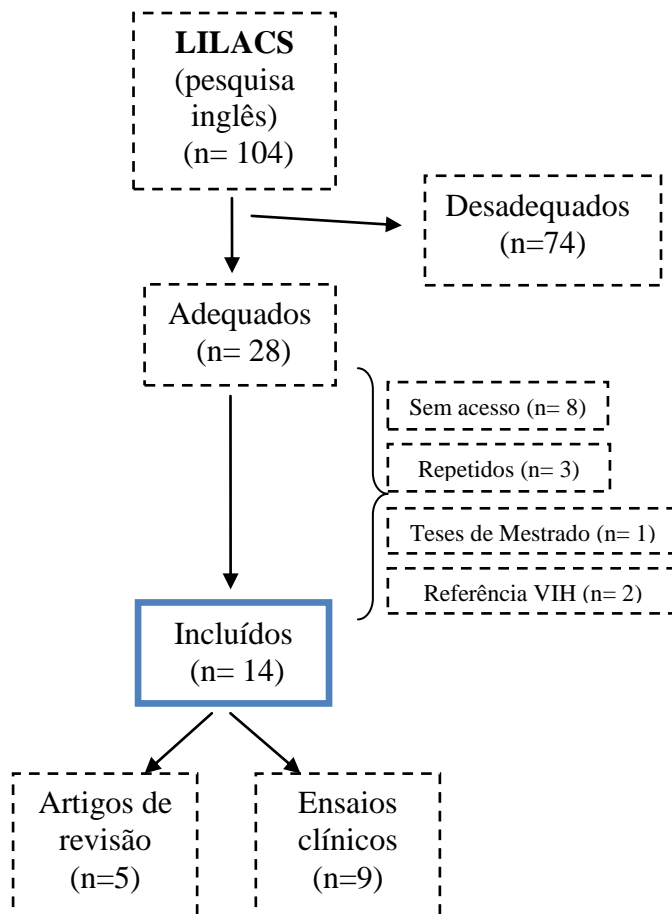
ANEXO I- Resumo da metodologia utilizada

Bases de dados secundárias:



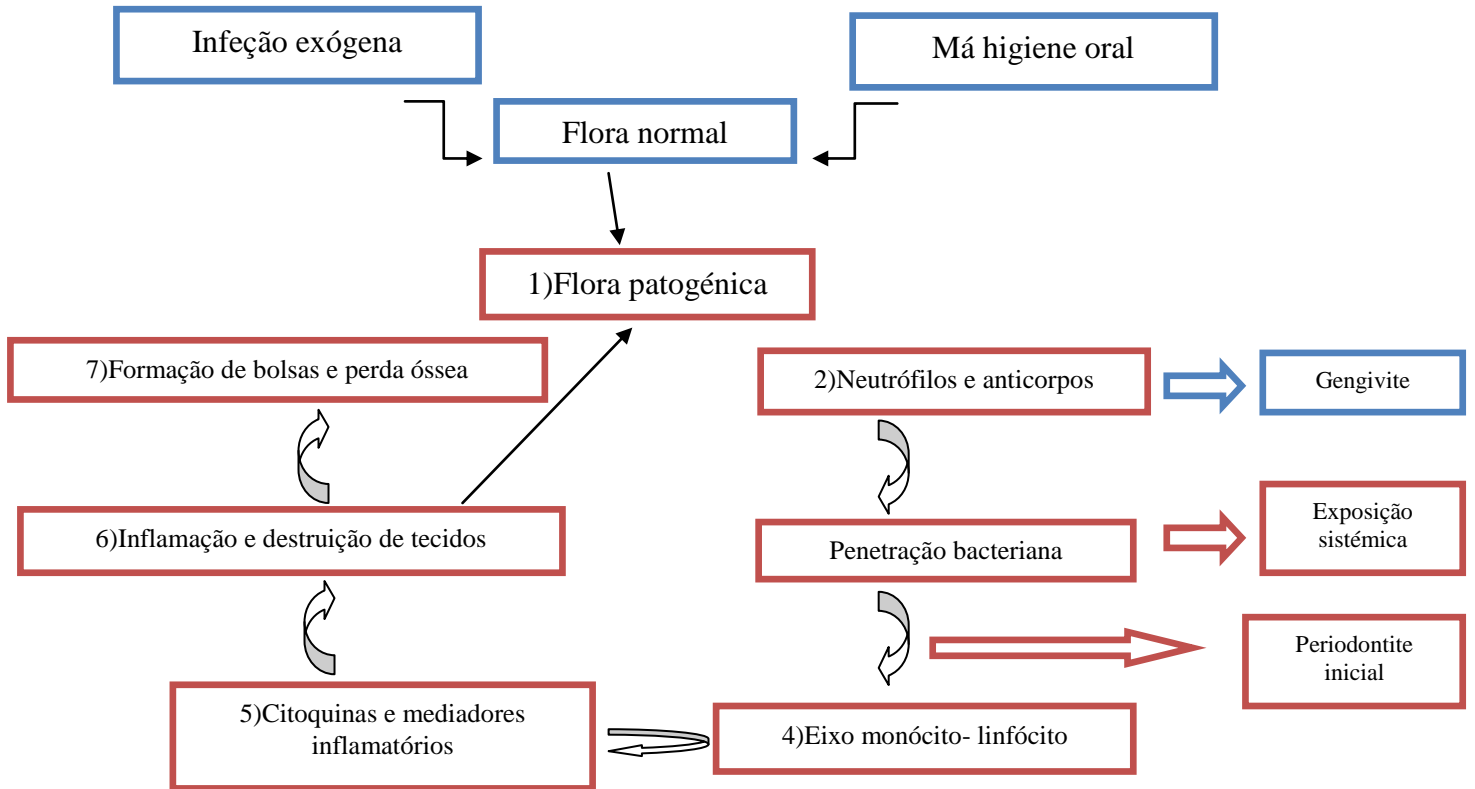
Bases de dados primárias:





Total de artigos revistos
(n= 64)

ANEXO II- Modelo de Offenbacher da etiopatogénese da doença periodontal. Adaptado de Escudero-Castaño et al. (2008)



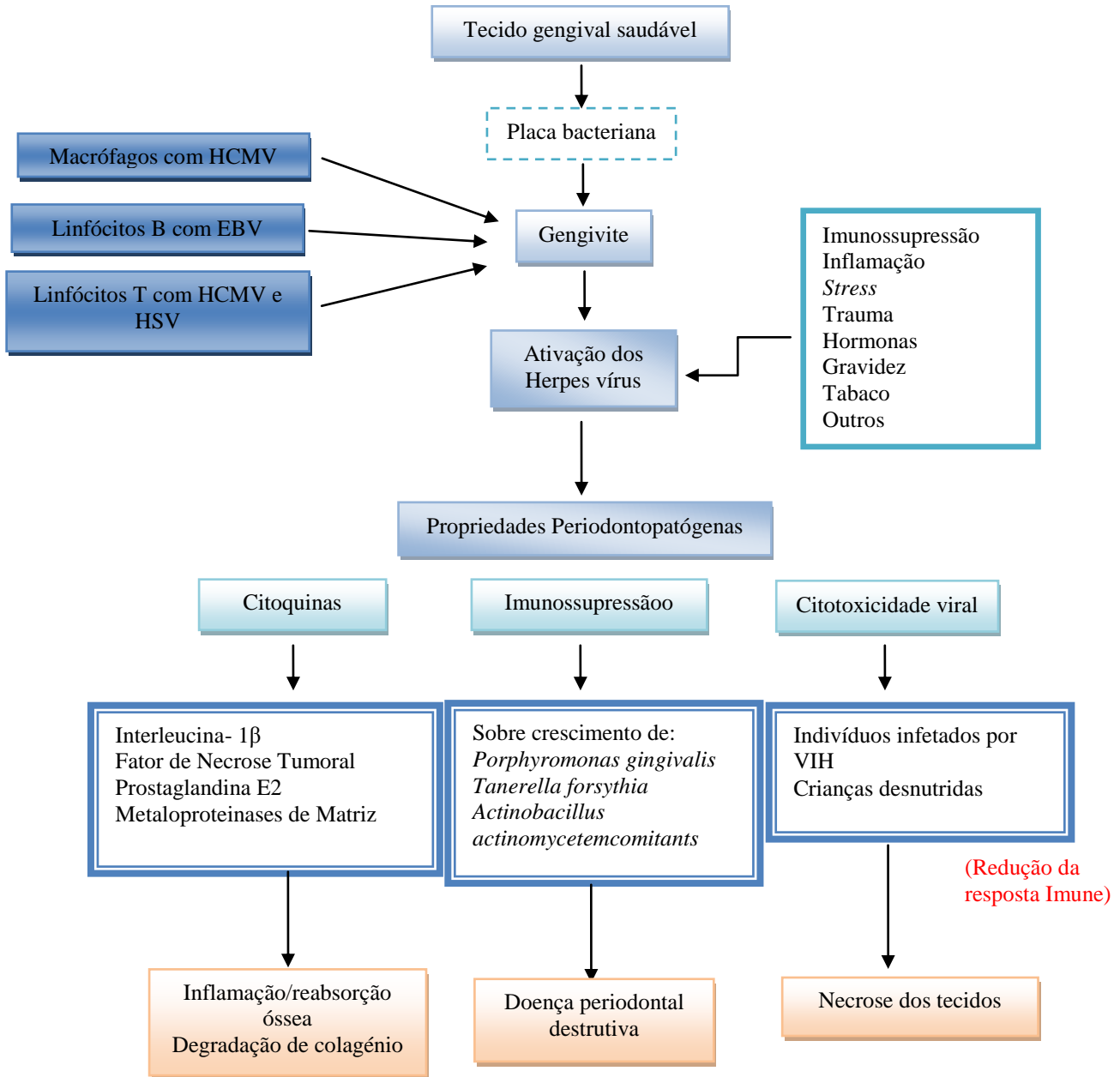
ANEXO III- Classificação das doenças periodontais. Adaptado de Armitage et al, 1999

I. Doenças gengivais	A. Induzidas por placa B. Não induzidas por placa
II. Periodontite Crônica	A. Localizada B. Generalizada
III. Periodontite Agressiva	A. Localizada B. Generalizada
IV. Periodontite como manifestação de doenças sistêmicas	A. Associada a desordens hematológicas B. Associada a desordens genéticas C. Outras não especificadas
V. Doenças periodontais necrosantes	A. Gengivite ulcerativa necrosante (GUN) B. Periodontite ulcerativa necrosante (PUN)
VI. Abscessos do periodonto	A. Abscesso gengival B. Abscesso periodontal C. Abscesso pericoronário
VII. Periodontite associada a lesões endodônticas	A. Lesões combinadas endo-periodontais
VIII. Deformidades e condições de Desenvolvimento ou adquiridas	A. Fatores localizados relacionados com o dente que modificam ou predispõem a doença gengival e periodontal induzida por placa bacteriana B. Deformidades mucogengivais e condições em redor do dente C. Deformidades e condições mucogengivais em áreas edêntulas D. Trauma oclusal

**ANEXO IV-Patologias e manifestações orais associadas aos vírus da família
herpesviridae. Adaptado de Cappuyns et al. (2005)**

Vírus	Patologia	Manifestação oral
Vírus herpes simples	Gengivioestomatite herpética primária Herpes labial Gengivioestomatite herpética recorrente	Ulceração vesiculosa
Vírus Varicella-Zoster	Varicela Herpes zoster	Ulceração vesiculosa
Vírus Epstein-Barr	Mononucleose infecciosa Leucoplasia pilosa Linfomas	Ulcerações e petéquias no palato Lesão branca
Citomegalovírus humano	Mononucleose infecciosa Reativação	Ulceração vesiculosa
Herpesvírus humano 6	Desconhecida	Desconhecida
Herpesvírus humano 7	Desconhecida	Desconhecida
Herpesvírus humano 8	Sarcoma de Kaposi	_____

ANEXO V- Modelo para a periodontite relacionada com Herpes vírus. Adaptado de Escalona & Limonchy, 2009



ANEXO VI- Herpesvírus detetados em localizações periodontais por PCR

Autor e ano	Número de pacientes incluídos	Amostra coletada	Forma de colheita amostras	Método de detecção	Resultados principais
Kamma & Slots. 2001	n= 16 16 Pacientes c/ PA	Placa subgengival	Cureta esterilizada	<i>Nested</i> PCR	EBV-1: 43,8% localizações ativas vs 12,5% localizações estáveis HSV: 34,5% localizações ativas vs 9,4% localizações estáveis Co-infecção dos 3 herpesvírus em 43,8% LA vs 3,1% LE
Contreras & Slots 2001	n=26 Em todos os pacientes incluídos tinha sido detetado HSV em bolsas periodontais através de <i>Nested</i> PCR	Placa subgengival	Cones de papel	<i>Nested</i> PCR	Em todos os pacientes foi detetado HSV-1 e em nenhum foi detetado HSV-2
Slots et al. 2002	n=16 16 pacientes com PA	Placa subgengival	Cones papel	<i>Nested</i> PCR	CMV, HSV e EBV-1 mais frequentemente detetados em localizações ativas vs localizações estáveis de doença
Slots et al. 2003	n=16 16 pacientes com Periodontite agressiva (PA)	Placa subgengival	Cones papel	<i>Nested</i> PCR	CMV e HSV são preditores da presença subgengival de <i>Pg</i>
Saygun et al. 2004	n= 34 18pacientes c/ PA 16 pacientes no GC	Placa subgengival	Cureta esterilizada	PCR	No grupo de PA: CMV, EBV-1 e HSV-1: 72-78%; <i>P.gingivalis</i> , <i>T. forsythia</i> e <i>C.rectus:</i> 78-83%; <i>P. intermedia</i> e <i>A.a.:</i> 44%; HSV-2: 17% No grupo Ps: EBV-1: detetado em 1 paciente Bactérias: 0-19%
Kubar et al. 2004	n= 32 16 pacientes c/ PA 15 pacientes no GC	Placa subgengival	Cureta esterilizada	TaqMan <i>Real-time</i> PCR	CMV: 68,8% do grupo PA, 0% do Grupo Ps

Konstantinidis et al. 2005	n=31 20 pacientes com PC 11 pacientes no GC	Placa subgingival	Cones papel	<i>Real-time</i> PCR	EB detectado em: 11pacientes c/ PC vs 1 GC
WU et al. 2006	n=154 65 Pacientes c/PC 65 Pacientes c/ gengivite 24 Pacientes no GC	Placa subgingival do grupo PC e amostras sulculares dos outros 2 grupos	Cones de papel	<i>Nested</i> PCR	EBV-1: Grupo PC- 47,7%; Grupo gengivite- 24,6%; Grupo PS- 16,7% EBV-2: Grupo PC- 15,4%; Grupo gengivite- 7,7%; Grupo PS- 0%
Moghim et al. 2007	n= 101 61 pacientes no grupo c/ PC (PS \geq 6 mm) 40 pacientes no GC	Placa subgingival	Cureta esterilizada	<i>Nested</i> PCR	EBV-1: 37 amostras ou 60,7% do grupo PC 1 amostra ou 2,5% do grupo controlo/GC
WU et al. 2007	n=284 143 Pacientes c/PC 65 Pacientes c/ gengivite 76 Pacientes no GC	Placa subgingival	Cones de papel	<i>Nested</i> PCR	CMV: Grupo PC- 79%; Grupo gengivite- 75,5%; Grupo PS- 76,3% EBV-1: Grupo PC- 63,6%; Grupo gengivite- 32,3%; Grupo PS- 30,3% CMV gB-II e coinfeção de CMV gB-II Com EBV-1 associados a inflamação e destruição tecidual
Botero et al. 2008	n= 68 37 pacientes c/ PC 7 pacientes c/ PA 24 pacientes no GC	Placa subgingival	Cones de papel	<i>Nested</i> PCR + <i>Real-time</i> PCR + Meio de Cultura	CMV: <u><i>Nested</i> PCR:</u> 79,5% em doença vs 25% GC <u><i>Real-time</i> PCR:</u> 47,7% vs 4,1% no GC <u>Cultura:</u> 2,3% no grupo de doença
Sunde et al. 2008	n= 80 25 pacientes c/ DP 15 pacientes no GC 40 pacientes c/ periodontite apical	Placa subgingival	Cureta esterilizada (amostras dos DP) + Cones de papel (amostras do GC)	<i>Real-time</i> PCR + Hibridização <i>in situ</i> + Análise imuno-histoquímica	Das 25 amostras de periodontite marginal: EBV: 40% CMV: 12% Das 40 amostras de periodontite apical: EBV: 50% CMV: 0% Não foram detetados vírus através da hibridização <i>in situ</i> para o EBV e análise imuno-histoquímica para o CMV

Saygun et al. 2008	n= 30 9 pacientes c/ PA 6 pacientes c/ PC 15 pacientes no GC	Placa subgengival	Cureta esterilizada	<i>Real-time</i> PCR	CMV: detetado em 8 Loc. Periodontais vs 1 Loc. saudável EBV: detetado em 9 Loc. Periodontais vs 2 Loc. saudável
Chalabi et al. 2008	n= 101 61 pacientes c/ PC 40 pacientes no GC	Placa subgengival	Cureta esterilizada	<i>Nested</i> PCR	EBV-1: 73,8% EBV-2: 4,9% CMV: 59% Não foi encontrada uma associação c/ a profundidade de sondagem
Nibali et al. 2009	n=140 16 pacientes c/ PAL 64 pacientes c/ PAG 20 pacientes c/PC 40 pacientes no GC	Placa subgengival + Sérum	Cureta esterilizada	<i>Real-time</i> PCR + Imunofluorescência de detecção indireta	CMV: não foi detetado em nenhuma das amostras EBV: 25% indiv. PAL, 3% PAG e 10% Ps HSV e VZV: não detetado no subgrupo estudado (20 amostras)
Bilichodmath et al. 2009	n= 33 19 pacientes c/ PC 14 pacientes c/ PA	Placa subgengival	Cureta esterilizada	<i>Multiplex</i> PCR	Grupo PC: HSV-1: 100%; HSV-2: 15,7%; EBV: 78,9% CMV: 26,31% Grupo PA: HSV-1: 57,14%; HSV-2: 0%; EBV: 28,57% CMV: 82,5%
Chalabi et al. 2010	n= 80 40 pacientes no grupo c/ PC (PS ≥ 6 mm ou ≤ 3mm) 40 pacientes no GC	Placa subgengival	Cureta esterilizada	<i>Multiplex e Nested</i> PCR	No grupo de PC c/ PS ≥ 6 mm: P.gingivalis: 95% T. forsythia: 75% EBV-1: 72,5% CMV: 50% A.a. : 12,5% EBV-2: 10% Não foram encontradas associações significativas quando a PS ≤ 3mm
Monzón et al. 2011	n=30 30 pacientes c/ PC	Placa subgengival	Cones papel	PCR	HSV: detectado em 17% dos pacientes; correlacionado com a severidade da DP
Das et al. 2012	n=10 Grupo1- GC Grupo 2- PC Grupo 3- PA	Placa subgengival	Cones de papel	<i>Multiplex</i> PCR	HSV-1: Grupo PC- 76%, Grupo PA- 80% HSV-2: Grupo PC-12%, Grupo PA- 8% EBV: Grupo PC- 32% Grupo PA- 32% CMV: Grupo PC-28% Grupo PA- 12%

Farias et al. 2013	n=44 28 pacientes c/ Periodontite crónica 16 pacientes no Grupo controlo (GC)	Placa subgingival	Cones de papel n° 40	PCR	EBV: não detectado
Kato et al. 2013	n=105 85 pacientes c/ PC 20 pacientes no GC	Placa subgingival	-----	<i>Nested</i> PCR	EBV: detectado 45% dos pacientes do GC vs 48% pacientes PC (≤ 3mm) vs 56% pacientes PC (≥ 5mm)
Stein et al. 2013	n= 130 65 Pacientes c/PAG 65 Pacientes no GC	Placa subgingival	Cones de papel	<i>Real-time</i> PCR	HSV-1 e CMV: 1,5% nos 2 grupos EBV: 10,8% no grupo PA e 13,9% no GC IgG e IgM contra HSV- 1, EBV e CMV não mostraram diferenças significativas entre o grupo PA e GC
Watanabe et al. 2007	n=30 30 pacientes c/ PA	Fluido crevicular (bolsas profundas e não profundas)	Cones de papel	PCR	EBV-1: 77% pacientes; 57% das localizações c/ periodontite; 30% das localizações c/ gengivite CMV: 6% dos pacientes; presente em 1 amostra de periodontite; presente em 1 amostra de / gengivite
Foglio-Bonda et al. 2010	n= 50 50 pacientes periodontalmente sãos	Fluido crevicular	Cones de papel	PCR	CMV: detetado em 33% dos pacientes Não foram observadas diferenças entre os pacientes c/ e s/ CMV relativamente a hábitos tabágicos (p=0,33), alcoólicos (p=0.94) e reabilitações protéticas (p=0.89)
Grenier et al. 2009	n=41 4 pacientes c/ gengivite 31 pacientes c/ Doença Periodontal 13 pacientes no GC	Fluido crevicular	Tiras de papel 2x10mm	<i>Nested</i> PCR	CMV: 8% PS 25% Gengivite 35% DP EBV: 23% PS 0% Gengivite 3% DP HSV: 13% DP
Sugano et al. 2004	n= 33 33 pacientes c/ DP	Saliva estimulada (pastilha de parafina)	-----	<i>Real-time</i> PCR	EBV: 48,5%
Idesawa et al. 2004	n= 53 33pacientes c/ DP 20 pacientes Ps no Grupo controlo	Saliva estimulada (pastilhas de parafina)	-----	<i>Real-time</i> PCR	EBV: 48,5% grupo DP e 15% do grupo PS

Imbronito et al. 2008	n= 40 40 pacientes c/ PC	Placa subgingival + Saliva não estimulada + Sangue periférico	Cones de papel + Tubo plástico + Punctura	<i>Nested PCR</i>	EBV-1: 45%, 37,5% e 25% na placa subgingival, saliva e sangue periférico, respectivamente CMV: 82,5% na placa subgingival e saliva e 75% no sangue periférico.
Dawson et al. 2009	n= 65 65 Pacientes c/PC	Saliva (5 mL de saliva não estimulada) + Placa subgingival	Tubo de plástico esterilizado + Cureta esterilizada	<i>Real-time PCR</i>	EBV: 81,5% na saliva; 44% na placa subgingival CMV: 1,5% saliva vs 0,3% placa subgingival
Bilder et al. 2013	n= 59 1 grupo c/ PC 2 grupos controlo	Saliva (1mL de saliva não estimulada)	Cones de papel	<i>Real-time PCR</i>	CMV: 15% no grupo PC VS 0% nos GC CMV: 59,4% localizações ativas vs 12,5% em localizações estáveis
Cassai et al. 2003	n= 23 13pacientes c/ PC 10 pacientes no Grupo controlo	Tecido gengival	Biópsias gengivais (cirurgias periodontal, extrações dentárias ou cirurgia plástica periodontal)	<i>Nested PCR</i>	HHV-6; Grupo PC: 8% Loc. Afetadas; 0% Loc. Não afetadas HHV-7: 77% do grupo c/ PC e 70% do GC .77% Loc. Afetadas; 54% Loc. Não afetadas HHV-8: : 7,7% do grupo c/ PC e 0% do GC
Contreras et al. 2000	n= 25 Todos os pacientes incluídos foram sujeitos a cirurgia periodontal	Tecido gengival + Placa subgingival	Biópsias gengivais + Cones de papel	<i>Nested PCR</i>	Loc. Saudáveis: <u>Placa subgingival:</u> 9% CMV,18% EBV-1; <u>Amostras de tecido gengival:</u> 18% CMV,27% EBV-1; Loc. periodontais: <u>Placa subgingival:</u> 64% CMV,86% EBV-1; <u>Amostras de tecido gengival:</u> 43% CMV,79% EBV-1;
Kubar et al. 2005	n= 20 16 pacientes c/ PA 11 pacientes c/ PC	Placa subgingival + Tecido gengival	Cureta esterilizada	TaqMan <i>Real-time PCR</i>	CMV: 78%, 46% das amostras subgingivais e 33%, 9% das amostras gengivais dos grupo c/ PA e PC, respetivamente EBV: 89%, 46% das amostras subgingivais e 78%, 46% das amostras gengivais dos grupo c/ PA e PC, respetivamente
Rotola et al. 2008	n= 37 13pacientes c/ PC 11pacientes c/ PA 13 pacientes no Grupo controlo	Tecido gengival	Biópsias gengivais (cirurgias ósseas recetivas, extrações dentárias ou cirurgia plástica periodontal)	<i>Nested PCR</i>	HHV-7: 91,7% no grupo c/ DP; 61,5% no grupo Ps EBV: 50% no grupo c/ DP; 7,7% no grupo Ps; detetado em 50% das localizações afetadas vs 16,7% das localizações sãs

Legenda: PC- Periodontite crónica, GC- Grupo controlo; vs- versus , DP-Doença periodontal, Ps-Pacientes saudáveis, c/-com; PA- Periodontite agressiva; CMV- citomegalovírus HSV- herpesvírus simples EBV- vírus epstein-barr LA- localizações ativas; LE-localizações estáveis; PS- profundidade de sondagem;PAL-periodontie agressiva localizada; PAG- periodontite agressiva generalizada; indiv.- indivíduos; Loc.- localizações.