



---

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

CITOMEGALOVÍRUS, HERPESVÍRUS HUMANO 6,  
HERPESVÍRUS HUMANO 7 E PERFIL IMUNOFENOTÍPICO  
DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO NA PERIODONTITE  
CRÔNICA MARGINAL

Ronaldo Luis Thomasini

Campinas, 2011





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

CITOMEGALOVÍRUS, HERPESVÍRUS HUMANO 6,  
HERPESVÍRUS HUMANO 7 E PERFIL IMUNOFENOTÍPICO  
DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO NA PERIODONTITE  
CRÔNICA MARGINAL

Ronaldo Luis Thomasini

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Clínica Médica, área de concentração em ciências básicas. Sob orientação da Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa.

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

T361c Thomasini, Ronaldo Luis, 1978 -  
Citomegalovírus, herpesvírus humano 6,  
herpesvírus humano 7 e perfil imunofenotípico do  
infiltrado inflamatório na periodontite crônica  
marginal. / Ronaldo Luis Thomasini. – Campinas,  
SP : [s.n.], 2011.

Orientador : Sandra Cecília Botelho Costa  
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Citomegalovírus. 2. Herpesvírus humano  
6. 3. Herpesvírus humano 7. 4. Periodontite  
crônica. 5. Inflamação. I. Costa, Sandra Cecília  
Botelho. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Cytomegalovirus, human herpesvirus 6, human herpesvirus 7 and immunophenotypic profile of inflammatory infiltrate in marginal chronic periodontitis

**Palavra-chave em inglês:**

Cytomegalovirus

Human herpesvirus 6

Human herpesvirus 7

Chronic periodontitis

Inflammation

**Área de concentração:** Ciências Básicas

**Titulação:** Doutor em Clínica Médica

**Banca examinadora:**

Sandra Cecília Botelho Costa [Orientador]

Victor Hugo Aquino Quintana

Andrea Gusmão Cunha

Luis Augusto Passeri

Maria Lourdes Barjas-Castro

**Data da defesa:** 04-11-2011

**Programa de Pós-Graduação:** Clínica Médica

---

## Banca examinadora da tese de Doutorado

Ronaldo Luis Thomasini

---

---

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Cecilia Botelho Costa

---

---

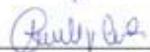
### Membros:

---

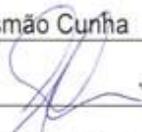
1. Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana



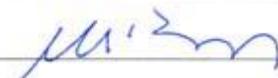
2. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andrea Mendonça Gusmão Cunha



3. Prof. Dr. Luis Augusto Passeri



4. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria de Lourdes Rios Barjas Castro



5. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Cecília Botelho Costa



Curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

Data: 04/11/2011

---

## **DEDICATÓRIA**

*Á Deus acima de todas as coisas...*

*Á meus amados Pais Tereza e Osvaldo,*

*por tudo o que fizeram por mim!*

*Á Fabiana, o Amor da minha vida!*

## **AGRADECIMENTOS**

---

Á Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa pela confiança depositada em mim!

Aos colegas do laboratório: Sandra, Paula, Célia e tantos outros que eu nem poderia enumerar...

*Á Norma por sempre estar disposta a me ajudar!*

*Á Marília e a Viviane por ter participado ativamente na padronização das técnicas...*

*À Dra. Sonia Bonacin pela coleta de algumas amostras usadas na padronização.*

*Ao Dr. Marcos Giorgetti e a Profa. Daniele Salami por ter apoiado este estudo.*

*Á Renata Barbieri pelo apoio técnico,*

*Dra. Grasiela Aguiar e Dra. Ana Veiga pela importante ajuda!*

*Á Dra. Nick pela correção do paper.*

*Á Dra. Luciana Meirelles pelo fornecimento de controle positivo para o CMV.*

*Ao departamento de patologia da UNESP-BOTUCATU pelo fornecimento de tonsila usada para o controle de HHV-6 e HHV-7.*

*Á fundação Hermínio Ometto pela possibilidade de utilização dos laboratórios.*

*“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.  
É melhor tentar, ainda que em vão que sentar-se, fazendo nada até o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder.  
Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver”*

**Martin Luther King**

*RESUMO*



Periodontite humana crônica é um processo inflamatório caracterizado por denso acúmulo de células imunes no tecido periodontal. A periodontite pode levar a perda do dente no paciente e a patogênese desta doença não é completamente conhecida. Este estudo testou a hipótese de que as células do infiltrado inflamatório podem abrigar betaherpesvírus e estes vírus estão ligados á subpopulação específicas de linfócitos. Fragmentos de tecido periodontal foram obtidas de pacientes afetados por periodontite e de indivíduos saudáveis. Imuno-histoquímica foi realizada para a contagem de células CD19<sup>+</sup>, células CD3<sup>+</sup> e células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Reação em cadeia da polimerase e imuno-histoquímica foram realizados para detectar citomegalovírus, herpesvirus humanos 6 e 7 nas amostras. Como esperado, os tecidos coletados de indivíduos saudáveis não apresentaram nível significativo de infiltrado inflamatório e, portanto, foram excluídos dos procedimentos de imunofenotipagem. Os resultados mostraram que células CD19<sup>+</sup> foram discretamente predominantes sobre as células CD3<sup>+</sup> no tecido periodontal afetado, mas estatisticamente não significativo. A subpopulação CD4<sup>+</sup> de linfócitos estava significativamente em maior número que a subpopulação CD8<sup>+</sup> de linfócitos (P=0,004), nas amostras. Citomegalovírus e herpesvírus humano 7 foram encontrados em locais afetados, mas não no tecido coletado de indivíduos saudáveis (P=0,04 e P=0,04, respectivamente). Herpesvirus humano 6 foi raramente detectado. Foi encontrado correlação entre citomegalovírus com menor relação de CD19<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> (P=0,003) e herpesvirus humano 7 com menor relação CD19<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> (P=0,003) e maior relação de CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (P=0,002). Imuno-histoquímica foi negativa para citomegalovírus, herpesvirus humano 6 e herpesvirus humano 7 em todas as amostras. Este estudo mostra que citomegalovírus e herpesvírus humano 7 podem estar presentes em regiões afetadas pela periodontite, mas são incomuns em regiões saudáveis. Além disso, este estudo sugere que citomegalovírus pode ser relacionado ao infiltrado inflamatório, com predomínio de células CD3<sup>+</sup> e, herpesvirus humano 7 pode estar relacionado ao infiltrado inflamatório com predomínio de células CD4<sup>+</sup>. Os dados sugerem que citomegalovírus e herpesvírus humano 7 podem estar presentes no infiltrado inflamatório, em estado de latência. No entanto, outros métodos deveriam ser realizados para confirmar esta hipótese.

**Palavras-chave:** Citomegalovírus, herpesvirus humano 6, herpesvirus humano 7, periodontite crônica, inflamação.

*ABSTRACT*



Human chronic periodontitis is an inflammatory process characterized by dense accumulation of immune cells in the periodontal tissue. The periodontitis can lead to loss of teeth in the patient and the pathogenesis of this disease is not completely known. This study tested the hypothesis that cells within inflammatory infiltrate can harbor betaherpesviruses and these viruses are linked to specific lymphocyte subpopulation. Biopsies of periodontal tissue were taken from periodontitis affected and from healthy subjects. Immunohistochemistry was performed to count CD19<sup>+</sup> cells, CD3<sup>+</sup> cells, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cell subsets. Polymerase chain reaction and immunohistochemistry were performed to detect cytomegalovirus, human herpesvirus 6 and 7 in the samples. As expected, tissues collected from healthy subjects presented no significant level of inflammatory infiltration and therefore were excluded from immunostaining procedures. The results showed that CD19<sup>+</sup> cells had discrete predominance over CD3<sup>+</sup> cells in the periodontitis affected tissue but not statistically significant. CD4<sup>+</sup> lymphocyte subset were significantly higher than CD8<sup>+</sup> lymphocyte subset (P=0.004) in the samples. Cytomegalovirus and human herpesvirus 7 were found in affected sites but not in tissue collected from healthy subjects (P=0.04 and P=0.04, respectively). Human herpesvirus 6 was rarely detected. We found a correlation between cytomegalovirus with lower CD19<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> ratios (P=0.003) and human herpesvirus 7 with lower CD19<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> ratio (P=0.003) and higher CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratios (P=0.002). Immunohistochemistry was negative for cytomegalovirus, human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 in the total of samples. This study shows that cytomegalovirus and human herpesvirus 7 can be present in periodontitis affected sites but are uncommon in healthy sites. Moreover, this study suggests that cytomegalovirus can be related to inflammatory infiltrate with predominance of CD3<sup>+</sup> cells and, human herpesvirus 7 can be related to inflammatory infiltrate with predominance of CD4<sup>+</sup>. The data suggest that cytomegalovirus and human herpesvirus 7 could be present in the inflammatory infiltrate in latent state. However, different methods should be performed to confirm this hypothesis.

**Key-words:** Cytomegalovirus, humanherpesvirus 6, human herpesvirus 7, chronic periodontitis, inflammation.

<b>PC</b>	Periodontite Crônica
<b>PA</b>	Periodontite Agressiva
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana Adquirida
<b>IL-1</b>	Interleucina 1
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de Necrose Tumoral alfa
<b>CMV</b>	Citomegalovírus
<b>HHV-6</b>	Herpesvírus Humano tipo 6
<b>HHV-7</b>	Herpesvírus Humano tipo 7
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>HSV-1</b>	Herpesvirus Humano tipo 1
<b>HSV-2</b>	Herpesvirus Humano tipo 2
<b>SIDA</b>	Síndrome da Imunodeficiência Humana
<b>HHV-6A</b>	Herpesvírus Humano tipo 6 variante A
<b>HHV-6B</b>	Herpesvírus Humano tipo 6 variante B
<b>CD</b>	Determinante de Grupamento
<b>T-CD4<sup>+</sup></b>	Célula T positiva para o determinante de grupamento 4 (T-helper, T-auxiliar)
<b>T-CD8<sup>+</sup></b>	Célula T positiva para o determinante de grupamento 8 (T-Citotóxico)
<b>CD3<sup>+</sup> (T)</b>	Células T totais (positiva para o determinante de grupamento 3)
<b>CD19<sup>+</sup> (B)</b>	Células B (positiva para o determinante de grupamento 19)
<b>IgG</b>	Imunoglobulina de classe G
<b>HLA</b>	Antígeno Leucocitário Humano
<b>≤</b>	Menor ou igual que
<b>≥</b>	Maior ou igual que
<b>PS</b>	Profundidade de Sondagem
<b>PCI</b>	Perda Clínica de Inserção
<b>°C</b>	Graus Celsius ou Centígrados
<b>μL</b>	Micro litro
<b>TRIS-HCl</b>	Tris-Hidroximetil-Aminometano
<b>mM</b>	Milimol
<b>μg</b>	Micrograma

<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>EDTA</b>	Ácido Etileno-Diamino-Tetracético
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>r.p.m.</b>	Rotações Por Minuto
<b>M</b>	Molar
<b>TE</b>	Tampão Tris (Tris-Hidroximetil-Aminometano)-EDTA(Ácido Etileno-Diamino-Tetracético)
<b>KCl</b>	Cloreto de Potássio
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de Magnésio
<b>dATP</b>	Desoxirribonucleotídeo Adenina Trifosfato
<b>dCTP</b>	Desoxirribonucleotídeo Citosina Trifosfato
<b>dGTP</b>	Desoxirribonucleotídeo Guanina Trifosfato
<b>dTTP</b>	Desoxirribonucleotídeo Timina Trifosfato
<b>Pmol</b>	Pico mol
<b>U</b>	Unidade
<b>q.s.p.</b>	Quantidade Suficiente Para
<b>μM</b>	Micro mol
<b>A</b>	Adenina
<b>T</b>	Timina
<b>C</b>	Citosina
<b>G</b>	Guanina
<b>MIE-4</b>	Iniciador MIE-4 ( <i>primer</i> )
<b>MIE-5</b>	Iniciador MIE-5 ( <i>primer</i> )
<b>IE-1</b>	Iniciador IE-1 ( <i>primer</i> )
<b>IE-2</b>	Iniciador IE-2 ( <i>primer</i> )
<b>EX-1</b>	Iniciador EX-1 ( <i>primer</i> )
<b>EX-2</b>	Iniciador EX-2 ( <i>primer</i> )
<b>IN-3</b>	Iniciador IN-3 ( <i>primer</i> )
<b>IN-4</b>	Iniciador IN-4 ( <i>primer</i> )
<b>TEB</b>	Tampão TRIS (Hidroxi-Metil-Aminometano)-EDTA(Ácido Etileno-Diamono-Tetracético)- Borato
<b>mL</b>	Mililitros
<b>PBS</b>	Tampão Salino Fosfatado
<b>FITC</b>	Isotiocianato de Fluoresceína
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-phenylindole
<b>nM</b>	Nano mol

<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>BSA</b>	Albumina Sérica Bovina
<b>HIB19</b>	Anticorpo Monoclonal contra Etipço CD19 (clone)
<b>HIT3a</b>	Anticorpo Monoclonal contra Etipço CD3 (clone)
<b>RPA-T4</b>	Anticorpo Monoclonal contra Etipço CD4 (clone)
<b>HIT8a</b>	Anticorpo Monoclonal contra Etipço CD8 (clone)
<b>C-10</b>	Anticorpo Monoclonal contra citomegalovirus
<b>C-11</b>	Anticorpo Monoclonal contra citomegalovirus
<b>Mab8533</b>	Anticorpo Monoclonal contra herpesvirus humano 6
<b>Mab8535</b>	Anticorpo Monoclonal contra herpesvirus humano 6
<b>Mab-KR-4</b>	Anticorpo Monoclonal contra herpesvirus humano 7
<b>HRP</b>	Peroxidase de Rábano Silvestre
<b>P</b>	Valor de P (estatístico)
<b>&gt;</b>	Maior que
<b>&lt;</b>	Menor que
<b>T-reg</b>	Célula T regulatória (CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> )
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico

	<b>PÁG.</b>
<b>Tabela 1-</b> Vírus do grupo herpes que infectam humanos.....	39
<b>Tabela 2-</b> Características clínicas e demográficas dos pacientes afetados por periodontite crônica e do grupo controle.....	50
<b>Tabela 3-</b> Sequência de bases dos iniciadores ( <i>primers</i> ) utilizados para a detecção do CMV, HHV-6 e HHV-7 e seus respectivos códigos de acesso ao <i>Genbank Database</i> .....	55
<b>Tabela 4-</b> Distribuição de CMV, HHV-6 e HHV-7 detectados por nested-PCR em biópsias coletadas de regiões afetadas por periodontite e indivíduos sadios (controle).....	64
<b>Tabela 5-</b> Freqüência de cada vírus detectado por nested-PCR e distribuído por perfil de marcador CD (relação) nas amostras analisadas.....	65

	<b>PÁG.</b>
<b>Figura 1-</b> Organização estrutural do genoma do CMV, HHV-6 e HHV-7.....	40
<b>Figura 2-</b> Desenho esquemático do dente e periodonto mostrando a região do tecido na qual foram obtidas as biópsias.....	49
<b>Figura 3-</b> Secções de tecido afetado por periodontite crônica corado pelo método de Giemsa.....	60
<b>Figura 4-</b> A mesma preparação mostrada na Figura 3 em aumento de 400x.....	61
<b>Figura 5-</b> Distribuição das amostras afetadas por periodontite de acordo o nível de infiltração ( <i>scores</i> ).....	61
<b>Figura 6-</b> Freqüências relativas de células CD19 <sup>+</sup> (células B) e células CD3 <sup>+</sup> (células T totais) e das sub-populações T-CD4 <sup>+</sup> e T-CD8 <sup>+</sup> no total de amostras obtidas de pacientes afetados por periodontite.....	62
<b>Figura 7-</b> Tecido periodontal marcado com anticorpo monoclonal de camundongo anti-CD3 humano conjugado à fluoresceína (FITC).....	63
<b>Figura 8-</b> Núcleos celulares no mesmo campo visto na Figura 5 corado com DAPI.....	63
<b>Figura 9-</b> Imagem combinada (sobreposta) das imagens mostradas nas Figuras 5 e 6..	63
<b>Figura 10-</b> Secção de tecido biopsiado de um paciente HIV positivo afetado por doença gastrintestinal por citomegalovírus positiva para antígenos de citomegalovírus por imuno-histoquímica (controle positivo).....	66
<b>Figura 11-</b> Mesma preparação mostrada na Figura 8 (outro campo) exibindo célula positiva para antígenos do CMV.....	66
<b>Figura 12-</b> Secção de linfonodo exibindo antígenos de HHV-6 em células positivas revelados por imuno-histoquímica com anticorpos monoclonais contra HHV-6 A/B (controle positivo).....	67

<b>Figura 13-</b>	Secção de tonsila exibindo célula positiva para antígenos de HHV-7 revelado por imuno-histoquímica com anticorpos monoclonais contra HHV-7 (controle positivo).....	67
<b>Figura 14-</b>	Mesma preparação mostrada da Figura 11 (outro campo) exibindo célula positiva para antígenos do HHV-7.....	68

	<b>PÁG.</b>
<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	23
<b>1.1- Doenças periodontais</b> .....	24
<b>1.2- Classificação das doenças periodontais</b> .....	26
<b>1.3- Características das doenças periodontais</b> .....	26
1.3.1- Doenças gengivais.....	27
1.3.2- As periodontites crônicas e agressivas.....	28
1.3.3- Periodontite como uma manifestação de doença sistêmica.....	28
1.3.4- Doenças periodontais necrozantes.....	29
1.3.5- Abscessos do periodonto.....	29
1.3.6- Periodontite associada a lesões endodôntica.....	30
1.3.7- <i>Condições e deformidades de desenvolvimento ou adquiridas</i> .....	30
<b>1.4- Patogenia das gengivites</b> .....	30
<b>1.5- Patogenia das periodontites</b> .....	31
<b>1.6- Fatores que influenciam no desenvolvimento e progressão das periodontites</b> .....	31
1.6.1- Virulência bacteriana.....	31
1.6.2- Tabagismo.....	33
1.6.3- Fatores genéticos.....	33

1.6.4- Diabetes mellitus.....	34
1.6.5- Envelhecimento.....	34
1.6.6- Desnutrição.....	35
1.6.7- Fármacos.....	35
1.6.8- Herpesvírus.....	36
<b>1.7- Os herpesvírus humanos.....</b>	<b>38</b>
1.7.1- Características gerais.....	38
1.7.2- Betaherpesvírus.....	39
1.7.2.1- Classificação e epidemiologia.....	39
1.7.2.2- Citomegalovírus.....	41
1.7.2.3- Herpesvírus humano 6.....	41
1.7.2.4- Herpesvírus humano 7.....	42
<b>1.8- Relação dos betaherpesvírus humanos com periodontite.....</b>	<b>44</b>
<b>2- OBJETIVOS.....</b>	<b>46</b>
<b>3- CASUÍSTICA E MÉTODOS.....</b>	<b>48</b>
<b>3.1- Casuística.....</b>	<b>49</b>
<b>3.2- Métodos.....</b>	<b>50</b>
3.2.1-Extração de DNA.....	51

3.2.2-Reação em Cadeia da Polimerase (nested-PCR).....	51
3.2.3-Nested-PCR para CMV.....	52
3.2.4-Nested-PCR para HHV-6 (A/B).....	52
3.2.5-Nested-PCR para HHV-7.....	53
3.2.6-Visualização dos produtos das nested-PCRs.....	54
3.2.7-Preparação e seccionamento dos tecidos.....	54
3.2.8-Coloração de Giemsa.....	55
3.2.9-Recuperação antigênica.....	55
3.2.10-Imuno-histoquímica para CD19, CD3, CD4 e CD8 (imunofenotipagem).....	56
3.2.11-Imuno-histoquímica para citomegalovírus, HHV-6 e HHV-7.....	56
3.2.12-Análise morfológica e imuno-histoquímica.....	57
3.2.13-Análise estatística.....	58
<b>4- RESULTADOS.....</b>	<b>59</b>
<b>4.1- Análise Morfológica.....</b>	<b>60</b>
<b>4.2 Imunofenotipagem.....</b>	<b>62</b>

<b>4.3- Nested-PCR para CMV, HHV-6 e HHV-7.....</b>	<b>64</b>
<b>4.4- CMV, HHV-7 e características imunofenotípicas do infiltrado.....</b>	<b>64</b>
<b>4.5- Imuno-histoquímica para CMV, HHV-6 e HHV-7.....</b>	<b>65</b>
<b>5- DISCUSSÃO.....</b>	<b>69</b>
<b>6- CONCLUSÃO.....</b>	<b>78</b>
<b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>80</b>
<b>8- ANEXO I – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....</b>	<b>93</b>
<b>8- ANEXO II - Artigo.....</b>	<b>94</b>

## *1- INTRODUÇÃO*

## 1.1- Doenças periodontais

Entende-se por doenças periodontais um conjunto de condições inflamatórias que começam afetando o tecido gengival e pode levar, com o tempo, à perda dos tecidos de suporte dos dentes. No início, alguns sintomas clínicos como sangramento e dor podem ocorrer, principalmente, após a escovação dos dentes. No entanto, a lesão gengival inicial pode ser assintomática (CARRANZA & NEWMAN, 1996).

Embora algumas doenças periodontais sejam causadas por agentes ou condições específicas (Ex. gengivoestomatite herpética primária, lesões sífilicas, gonorréia, fibromatose gengival hereditária), na maioria das vezes, vários fatores estão envolvidos no processo. Devido à grande variedade de quadros clínicos, amplitude de condições, agentes e fatores envolvidos, o diagnóstico e classificação dos casos nem sempre é tarefa fácil para o clínico. O estabelecimento de um ou mais agentes causais também pode ser difícil em muitos dos tipos de doenças periodontais (LINDHE, 1984).

Dentre as doenças periodontais, a periodontite crônica é o tipo de periodontite mais freqüente e não afeta, de forma homogênea, a todos os indivíduos. Além disso, no mesmo indivíduo, em dentes específicos pode ocorrer destruição avançada, o que poderia não acontecer em outros dentes (LINDHE *et al.*, 2005).

Apesar da maior compreensão da etiologia e patogênese das afecções periodontais, o diagnóstico e classificação destas doenças ainda é baseada quase inteiramente em avaliações clínicas tradicionais (*RESEARCH, SCIENCE AND THERAPY COMMITTEE*, 2003). Para chegar a um diagnóstico periodontal, o profissional deve pesquisar:

- 1) presença ou ausência de sinais clínicos de inflamação (por exemplo, sangramento durante o procedimento de verificação da profundidade de sondagem);
- 2) profundidade de sondagem propriamente dita;
- 3) extensão e padrão de perda de inserção clínica e do osso;
- 4) históricos médicos e odontológicos do paciente;

5) presença ou ausência de sinais e sintomas diversos, incluindo dor, ulceração e quantidade observáveis de placa e cálculos.

As periodontites crônicas são inflamações progressivas, caracterizadas clinicamente por sinais de inflamação gengival, sangramento à sondagem, diminuição da resistência dos tecidos periodontais à sondagem (bolsas periodontais), perda de inserção gengival e do osso alveolar. As características que podem variar incluem hiperplasia ou recessão gengival, exposição da furca, mobilidade e inclinação dentárias aumentadas e esfoliação dos dentes (FLEMMIG, 1999; LINDHE *et al.*, 2005).

As periodontites possuem etiologia multifatorial e inflamatória onde um complexo de espécies bacterianas extracelulares e, geralmente, gram-negativas e anaeróbias, principalmente, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum*, interage com o tecido do hospedeiro levando a liberação de citocinas inflamatórias, enzimas lisossomais, quimiocinas e mediadores. Algumas dessas substâncias podem levar a destruição das estruturas periodontais incluindo o tecido de sustentação do dente, osso alveolar e o ligamento periodontal (WU *et al.*, 2006). Este tipo de destruição pode levar a perda dos dentes no indivíduo afetado. Uma “bolsa” constituída por restos de alimentos, bactérias e exsudato contendo células inflamatórias é encontrada entre o dente e o tecido periodontal inflamado. O tratamento consiste basicamente da raspagem onde se retira a “bolsa inflamatória” e a placa bacteriana, associando-se ao uso de antibióticos e de anti-sépticos bucais (CARRANZA & NEWMAN, 1996). A doença periodontal é um importante problema de saúde pública e, representa a principal causa de perda dentária em adultos no mundo inteiro.

Um levantamento epidemiológico das condições de saúde bucal da população brasileira de 2002 a 2003, revelou que a porcentagem de pessoas sem nenhum problema periodontal nas faixas etárias de 15 a 19 anos, 35 a 44 e 65 a 74 anos de idade foi, respectivamente, 46,2%, 21,9% e 7,9%. Já em relação à doença periodontal grave, a porcentagem de doença presente foi de 1,3%, 9,9% e 6,3% nas mesmas faixas etárias. É importante considerar que, nesta última faixa etária, houve uma grande porcentagem de

indivíduos sem dentes ou com número muito reduzido de dentes o que levou a uma baixa prevalência de doença periodontal grave neste grupo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

O controle dessa doença é de extrema importância pelo fato de que, além da questão estética que, por si só, pode trazer consequências à auto-estima do indivíduo, foram encontradas associações e evidências epidemiológicas de que as infecções periodontais podem evoluir para infecções sistêmicas, principalmente em doenças cardiovasculares, cerebrovasculares, prematuridade, baixo peso ao nascimento, restrição do crescimento fetal e dificuldade do controle glicêmico no diabetes (LINDHE *et al.*, 2005, ZINA *et al.*, 2005).

## **1.2- Classificação das doenças periodontais**

Nas últimas décadas, houve um esforço considerável na tentativa de classificar as doenças periodontais de forma consistente, para permitir o correto diagnóstico e tratamento destas patologias tão heterogêneas.

Em 1989, cientistas e clínicos entraram em consenso que deveria existir um sistema de classificação de doenças periodontais. O *1<sup>st</sup> European Workshop In Periodontology* propôs uma classificação simples que posteriormente mostrou-se inadequada para o propósito pelo qual ela foi criada. Problemas como sobreposição de categorias de doenças, ausência de um componente gengival, inapropriada ênfase na idade do aparecimento da doença, indexação da progressão e critérios inadequados ou confusos contribuíram para a idéia que deveria haver uma revisão da classificação. Uma posterior classificação européia, em 1993, mostrou-se também inadequada devida à falta de detalhes necessários a correta classificação da amplitude da doença na prática clínica. Em 1996, durante o *World Workshop in Periodontics*, a necessidade da reclassificação é enfatizada e, em 1997, a *American Academy of Periodontology* forma um comitê, planeja e organiza uma revisão da classificação. Em 1999, o *International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions* finaliza a nova classificação, a qual foi largamente aceita (ARMITAGE, 1999).

Segundo o *International Workshop for a Classification of periodontal Diseases and Conditions*, as doenças periodontais podem ser classificadas da seguinte forma:

- I. Doenças gengivais;
- II. Periodontite crônica;
- III. Periodontite agressiva;
- IV. Periodontite como uma manifestação de doença sistêmica;
- V. Doenças periodontais necrotizantes;
- VI. Abscessos do periodonto;
- VII. Periodontite associada a lesões endodônticas;
- VIII. Condições e deformidades de desenvolvimento ou adquiridas.

Existem subdivisões dentro de muitas dessas condições clínicas elencadas acima, de acordo com critérios clínicos, etiológicos ou fatores diversos associados a cada uma delas.

### **1.3- Características das doenças periodontais**

#### **1.3.1- Doenças gengivais**

As doenças gengivais tais como foram classificadas, incluem uma variedade de diferentes doenças. A presença de um agente etiológico específico (microrganismos específicos) ou, se é consequência de uma condição clínica desencadeada por ação de agentes químicos ou físicos são os principais critérios de classificação dentro deste grupo.

Embora, muitas das doenças incluídas neste grupo se manifestam como gengivite que poderia, a princípio, ser considerada de menor gravidade, causa sintomas bastante intensos de grande impacto para o paciente. Existe um número relativamente grande de subdivisões nestas categorias de acordo com condições clínicas e etiológicas específicas como, por exemplo, lesões associadas à infecção oral por *Treponema pallidum* ou por *Neisseria gonorrhoea* (ARMITAGE, 1999).

### **1.3.2- As periodontites crônicas e agressivas**

A periodontite é caracterizada por uma reação inflamatória que afeta os tecidos de fixação do dente e pode ser classificada como periodontite crônica (PC) ou periodontite agressiva (PA), de acordo com as características clínicas e o ritmo de progressão da doença. (LIMA et al., 2011).

O início da periodontite crônica pode ocorrer em qualquer idade, todavia, essa é uma patologia mais frequentemente encontrada em adultos. Por outro lado, a periodontite agressiva acomete indivíduos saudáveis sendo caracterizada por grave perda de inserção clínica associada à rápida destruição óssea alveolar (*AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY*, 1999).

As periodontites crônicas e agressivas podem ser localizadas ou generalizadas, dependendo do número de dentes atingidos. Embora este critério clínico possa diferenciar as periodontites localizadas das generalizadas, aspectos fisiopatológicos diferentes podem também estar envolvidos nas duas formas. As periodontites podem ainda ser classificadas em periodontites marginais e periodontites apicais. As periodontites marginais afetam os tecidos que revestem, externamente, o dente, enquanto que as apicais afetam os tecidos que revestem a raiz do dente.

### **1.3.3- Periodontite como uma manifestação de doença sistêmica**

As periodontites como manifestação de doença sistêmica, como o próprio nome sugere, são doenças periodontais que ocorrem, secundariamente, a alguma outra manifestação clínica associada geralmente com desordem hematológica ou genética. Entre as manifestações hematológicas envolvidas encontram-se as leucemias e a neutropenia adquirida. As anomalias genéticas mais comumente associadas são a Neutropenia Cíclica Familiar, Síndrome de Down, Síndromes de Adesão Deficiente dos Leucócitos, Síndrome de Papillon-Lefèvre, Síndrome de Chediak-Higashi, Síndrome Histiocítica, Doença do Armazenamento do Glicogênio, Agranulocitose Genética Infantil, Síndrome de Cohen, Ehlers-Danlos (Tipos IV e VIII) e Hipofosfatasia (ARMITAGE, 1999).

Na maioria dos casos, essas formas de periodontite ocorrem devida à alterações na quantidade e/ou função de leucócitos causadas pela doença de base.

#### **1.3.4- Doenças periodontais necrozantes**

As doenças periodontais necrozantes se apresentam nas formas de gengivite ou periodontite dependente da presença ou ausência de envolvimento ósseo.

A Gengivite Ulcerativa Necrosante, embora seja pouco freqüente, quando comparada a outras doenças periodontais são clinicamente significativas, considerando a agressividade e, característica aguda e rápida da sintomatologia. As principais características clínicas são dor, necrose gengival limitada em sua margem e/ou nas papilas interdentais, sangramento gengival, mau odor e, por vezes, febre, linfadenopatia e mal-estar. Uma pseudomembrana de cor branco-amarelada ou cinza cobrindo as úlceras gengivais ocorre nesta situação. É necessário fazer o diagnóstico diferencial com a gengivoestomatite herpética primária, gengivite descamativa, pênfigo benigno das membranas mucosas, eritema multiforme exsudativo, gengivite estreptocócica, gengivite gonocócica e leucemia aguda. Muitos casos estão associados à infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (CORDEIRO, 2004).

A Periodontite Ulcerativa Necrosante compartilha muita das características da Gengivite Ulcerativa Necrosante com exceção que na periodontite, ocorre perda de inserção clínica óssea nas áreas afetadas (NOVAK, 1999).

#### **1.3.5- Abscessos do periodonto**

O abscesso periodontal é uma infecção bacteriana que se desenvolve no peridonto. No início, a infecção pode não afetar a estrutura principal do dente, mas pode causar dor. O sintoma mais comum de abscesso periodontal chamado de “bola de goma de mascar”, um inchaço do tecido da gengiva que parece sair desta. Outros sintomas, além deste, podem ocorrer, incluindo desconforto na mastigação do lado da boca onde está presente ou uma sensação de dor em todos os momentos. Quando o abscesso se rompe, um exsudato amarelo ou branco denso pode ser expelido na boca. Algumas vezes esta doença é induzida por corpos estranhos que ficam presos na região gengival (PRASAD *et al.*, 2001).

### **1.3.6- Periodontite associada a lesões endodôntica**

Existe uma íntima relação, tanto embrionária quanto física, entre os tecidos pulpar e peridontal. Portanto, pode ocorrer passagem de toxinas e bactérias de uma estrutura para outras, levando a reações, que dependerão da intensidade da infecção, da região anatômica e das condições de saúde do tecido.

Muitas vezes, o clínico pode sentir dificuldades de diferenciar lesões de origem pulpar, de origem periodontal, e lesões endo-pério verdadeiras pelo fato de uma lesão poder mascarar a outra (TERÇAS *et al.*, 2006; ANAND & NANDAKUMAR, 2005).

### **1.3.7- Condições e deformidades de desenvolvimento ou adquiridas**

Esta é a forma mais heterogênea, onde a doença pode ser provocada por diversos fatores. Efeitos por aparelhos ortodônticos, particularidades anatômicas do dente e de outras partes da boca, fratura e reabsorção da raiz, anormalidades na coloração, trauma e anormalidades da mucosa são os principais fatores envolvidos nesta forma clínica (ARMITAGE, 1999).

## **1.4- Patogenia das gengivites**

A Gengivite marginal crônica é clinicamente caracterizada por vermelhidão, edema, sangramento, mudanças no contorno, perda de tecido de adaptação para o dente e aumento do fluxo de fluido crevicular (CIMASONI, 1983; GREENSTEIN, 1984). A presença de placas bacterianas formada, principalmente, por *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum*, é essencial para o desenvolvimento da gengivite e acredita-se que estas provocam mudanças no tecido por mecanismos diretos e indiretos. Segundo a *American Academy of Periodontology* (1999), histopatologicamente, a gengivite é dividida em 3 estágios:

1) A lesão inicial aparece como inflamação aguda com infiltrado composto predominantemente por neutrófilos;

2) A lesão ainda recente muda para um tipo de infiltrado com predominância de linfócitos T;

3) A lesão bem estabelecida é caracterizada por predominância de linfócitos B e plasmócitos.

### **1.5- Patogenia das periodontites**

A periodontite é clinicamente diferenciada da gengivite porque há perda do tecido conjuntivo de ligamento do dente associada à inflamação gengival (LISTGARTEN, 1986). A perda do ligamento periodontal e o deslocamento deste do cemento, além de reabsorção do osso alveolar, ocorrem, levando a mobilidade do dente.

Os aspectos histopatológicos da periodontite são de certa forma, similares aos da gengivite com lesão bem estabelecida, com predominância de plasmócitos, com perda de elementos do tecido conjuntivo, mas adicionalmente ocorre reabsorção do osso (PAGE & SCHROEDER, 1982).

Os aspectos similares entre a gengivite e a periodontite não suportam muito bem a hipótese que a periodontite seria uma consequência provável da gengivite. Desta forma, os mecanismos que estão envolvidos na progressão da gengivite para periodontite não são claros e o que levaria a desencadear a lesão periodontal não é ainda bem conhecido (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 1999).

### **1.6- Fatores que influenciam no desenvolvimento e progressão das periodontites**

#### **1.6.1- Virulência bacteriana**

É amplamente aceito que o aparecimento e progressão da periodontite são dependentes da presença de microrganismos, principalmente, devido à formação de biofilme. Embora, mais de 300 espécies de microrganismos sejam encontrados nas bolsas periodontais, apenas a minoria deles, de fato, é considerada como agente etiológico (MOORE & MOORE, 1994). Os fatores de virulência são os principais indicadores para que um microrganismo seja considerado patogênico para a região periodontal. Constituintes do microrganismo e metabólitos são capazes de causar desequilíbrio homeostático ou do

sistema imune de defesa, levando ao aparecimento ou progressão da doença. A presença de microrganismos, com alto grau de virulência e, a quantidade destes presentes na região periodontal são fatores importantes na capacidade de produzir doença (ARMITAGE, 1999).

Os microrganismos considerados periodontopáticos possuem pelo menos 3 características que contribuem para o seu potencial patogênico:

1. Capacidade de colonização;
2. Capacidade de escapar de mecanismos imunes de defesa (principalmente, biofilme);
3. Capacidade de produzir substâncias que podem agir diretamente na destruição tecidual.

Algumas espécies como *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* estão incluídas entre as espécies consideradas patogênicas (ZAMBON *et al.*, 1996; HAFFAJEE *et al.*, 1994). No entanto, apenas algumas cepas parecem ter verdadeiro potencial periodontopático e a presença destes microrganismos na região periodontal não implica necessariamente na produção de doença.

Parece claro que, uma interação entre hospedeiro e microrganismo desempenha papel bastante importante na etiologia da periodontite. As bactérias precisam possuir a habilidade de sobreviver e se propagar no biofilme. Alguns dos fatores que podem promover virulência são moléculas como as adesinas que possuem capacidade de aderir à superfície dos tecidos ou outros microrganismos. As fímbrias também são relatadas como fatores de virulência, como neste último caso (KONEMAN *et al.*, 2001).

A presença de polissacarídeo capsular presente, por exemplo, na *P. gingivalis*, pode promover resistência da bactéria à ação de imunoglobulinas e do sistema complemento. A capacidade de invadir tecidos presentes nos dois patógenos mais importantes na região periodontal (*P. gingivalis* e *A. Actinomycetemcomitans*) é também de grande importância. A *P. gingivalis* invade e persiste nas células epiteliais e a *A. actinomycetemcomitans* pode atravessar o tecido epitelial e atingir o tecido conjuntivo

(LAMONT *et al.*, 1995; HOLT *et al.*, 1991). Dessa forma, parece claro que o processo inflamatório tende a ocorrer ou aumentar em consequência da presença de bactérias e o poder de invasão destas bactérias as tornam mais difíceis de serem eliminadas, pelo sistema de defesa do hospedeiro. Uma vez que a lesão está presente, outros microrganismos, que ocorrem naturalmente na região crevicular, podem atingir a região afetada e causar uma situação polimicrobial (NAHID *et al.*, 2011).

A região periodontal depende enormemente do sistema de defesa imune celular e humoral para manter o equilíbrio e evitar invasões microbianas. Situações que diminuem ou modulam a capacidade de defesa sistêmica ou local do sistema imune devem possuir grande influência da patogenia da doença periodontal. Várias situações foram listadas como sendo co-fatores na doença periodontal como tabagismo, fatores genéticos, diabetes, envelhecimento, desnutrição, fármacos e possivelmente herpesvírus (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 1999).

### **1.6.2- Tabagismo**

O tempo de uso do tabaco está associado com o aumento do risco de desenvolvimento de periodontite e com o grau de gravidade da doença. Os mecanismos hipoteticamente envolvidos nesta associação seriam a alteração da vascularização do tecido, efeito direto na microflora e efeitos inibitórios na atividade das imunoglobulinas e nos seus níveis para responder contra a placa bacteriana (KRALL *et al.*, 1997; SCHENKEIN *et al.*, 1997).

### **1.6.3- Fatores genéticos**

A periodontite costuma ser mais freqüente em pacientes com síndrome de Down, síndrome de Papillon-Lefèvre e síndrome de Chediak-Higashi. Apesar desta associação, os fatores biológicos que levam a esta maior freqüência não estão claros.

Nos indivíduos com síndrome de Down (trissomia do cromossomo 21) a periodontite parece estar associada com fatores como deficiência imune, higienização oral deficiente, fragilidade do tecido periodontal, senescência precoce, salivação e função mastigatória deficientes (AMANO *et al.*, 2008). Na síndrome de Papillon-Lefèvre, uma

doença autossômica recessiva, a dentição decídua cai prematuramente devido a grave inflamação da região periodontal, que geralmente não responde ao tratamento tradicional usado. Após a queda dos dentes decíduos, a gengiva apresenta-se normal, mas o processo inflamatório costuma repetir-se levando a queda da dentição permanente. Este tipo de periodontite parece estar associado ao baixo nível de neutrófilos, linfócitos e monócitos no tecido, o que predisporia a infecções por bactérias associadas às recorrentes infecções piogênicas na pele (JANJUA & KHACHEMOUNE, 2004).

Na síndrome de Chediak-Higashi, uma doença também autossômica recessiva, a periodontite está associada à imunodeficiência e estão expostos ao risco de periodontite grave (BAILLEUL-FORESTIER *et al.*, 2008).

#### **1.6.4- Diabetes mellitus**

Existe uma relação bidirecional entre o diabetes e a periodontite. A inflamação local agravada em diabéticos, com controle glicêmico inadequado, pode modificar o ambiente subgengival e, conseqüentemente, o perfil microbiano na subgengiva (CASARIN *et al.*, 2010). A microcirculação prejudicada pode estar envolvida nestas situações, como o que ocorre em outras partes anatômicas no paciente diabético. A Diabetes promove a ocorrência, a progressão e a gravidade da periodontite. Periodontite dificulta o controle glicêmico do diabetes, aumenta o risco de complicações associadas ao diabetes e, possivelmente, até mesmo do seu início. Segundo alguns autores, o tratamento das infecções periodontais deve tornar-se parte integrante do controle do diabetes, enquanto que o controle glicêmico é um pré-requisito para a terapia periodontal bem sucedida (DESCHNER *et al.*, 2011).

#### **1.6.5- Envelhecimento**

O risco de desenvolvimento de periodontite cresce gradativamente com o aumento da idade e vários fatores podem estar associados a este fato. O envelhecimento fisiológico está relacionado a um aumento na produção idiopática de mediadores inflamatórios, como a interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 6 (IL-6), caracterizando a manutenção de um estado pró-inflamatório no

indivíduo idoso (KRABBE *et al.*, 2004; MAGGIO *et al.*, 2006). Este baixo grau de inflamação tem sido associado com o processo patológico de doenças crônicas relacionadas à idade (MAGGIO *et al.*, 2006).

Fatores que também podem estar associados à periodontite em idosos são a desnutrição causada por problemas de mastigação, deglutição ou doenças incapacitantes, a imunosenescência e a osteoporose. A osteoporose e a periodontite são doenças frequentes que afetam o envelhecimento da população. Postula-se que ambas as condições podem estar relacionadas (MARTÍNEZ-MAESTRE *et al.*, 2010).

#### **1.6.6- Desnutrição**

Competência imunológica e estado nutricional são dois dos mais importantes determinantes de morbidade e mortalidade. Desnutrição prejudica as defesas inatas e adaptativas do hospedeiro, incluindo a função fagocitária, imunidade celular, sistema complemento, produção de anticorpos e de citocinas. Na desnutrição protéico-energética, há alterações marcantes na flora microbiana, resultando em uma preponderância de organismos patogênicos anaeróbios, o aumento da propensão de bactérias para ligar a células da mucosa bucal, a atenuação da resposta de fase aguda de proteínas, e disfunção do sistema de citocinas.

A depleção de nutrientes antioxidantes promove imunossupressão e aceleração da taxa de replicação dos herpesvírus, e a taxa de progressão para doenças relacionadas aos herpesvírus podem aumentar. Outro fator nutricional importante é a deficiência de fluoreto, cuja carência, aumenta sensivelmente a prevalência de cárie. Portanto, a desnutrição pode intensificar a gravidade das infecções orais e pode levar a sua evolução para doenças potencialmente fatais (ENWONWU *et al.*, 2002; CARRANZA & NEWMAN, 1996).

#### **1.6.7- Fármacos**

A utilização de drogas imunossupressoras, que interfere na resposta normal do sistema imune no indivíduo, poderia facilitar a invasão bacteriana, aumentando o risco de doença (PAGE & BACK *et al.*, 1997). Crescimento gengival com aumento da

profundidade de sondagem, induzido por ciclosporina, tem sido descrito na literatura (MONTEBUGNOLI *et al.*, 2002).

Contrariamente, alguns estudos sugeriram que a administração de drogas imunossupressoras diminui o nível de inflamação, mesmo na presença de altos níveis de placa bacteriana e que inflamação está ligada, primariamente, a resposta imune do indivíduo contra a placa (BEEN & ENGEL, 1982). Um estudo em que foi realizada uma comparação entre pacientes pós-transplante renal, pacientes com insuficiência renal crônica realizando hemodiálise e pacientes sistemicamente sadios apresentando periodontite mostrou que o nível de inflamação nos pacientes transplantados foi menor que nos outros (YAMALIK *et al.*, 1991).

O uso de corticóide combinado à antibióticos, na forma de pasta, no tratamento de reabsorção óssea, em um estudo experimental em macacos, mostrou-se efetivo (PIERCE & LINDSKOG *et al.*, 1987). Apesar das diferenças nos tipos de patologia investigada neste último estudo com a periodontite, parece razoável pensar que drogas com efeito imunossupressor poderiam ajudar a controlar a inflamação.

Este paradoxo entre o aparecimento de doença por facilitação de invasão microbiana devido à imunossupressão e diminuição da inflamação provocada pelo uso de imunossupressor, contribui para a idéia de que a periodontite é uma doença em que muitos fatores podem estar envolvidos.

### **1.6.8- Herpesvírus**

São classicamente conhecidas, as manifestações causadas pelo herpesvírus simples na região oral. Manifestações com lesão labial e, por vezes estomatites, ocorrem numa parcela considerável da população em algum momento da vida do indivíduo. Normalmente, essas lesões labiais são auto-limitadas, embora costumem ser recidivantes (KONEMAN *et al.*, 2001).

Desde 1990, outros herpesvírus têm sido considerados como patógenos emergentes na etiologia da periodontite. Particularmente, o citomegalovírus humano (CMV) poderia ter um importante papel na etiopatogenia dos diversos tipos desta doença.

O genoma deste vírus ocorre com certa frequência nas regiões afetadas por periodontite. (CONTRERAS *et al.*, 2000, CASSAI *et al.*, 2003).

O CMV tem sido considerado uma importante causa de morbidade e mortalidade em pacientes imunossuprimidos como àqueles transplantados de órgãos (THOMASINI *et al.*, 2007). Os herpesvirus humano 6 e herpesvirus humano 7 (HHV-6 e HHV-7), embora tenham papel menos claro, parecem estar também envolvidos em processos infecciosos diretos ou agirem, indiretamente, em mecanismos imunomodulatórios e influenciando em outros processos inflamatórios em pacientes transplantados (THOMASINI *et al.*, 2007; FELDSTEIN *et al.*, 2003; EMERY, 2001).

O CMV causa a citomegalovirose e, ambos HHV-6 e HHV-7 são os agentes causadores do exantema súbito (roseola), doença infecciosa comum na infância e geralmente benigna. O papel patogênico das infecções pelos herpesvirus é bastante explorado na literatura, em uma imensa gama de afecções. Seus respectivos potenciais patogênicos são consideráveis e em alguns casos, indiscutíveis (FREITAS *et al.*, 2004).

A maior parte dos trabalhos envolvendo herpesvírus em periodontite considera a reação em cadeia da polimerase (PCR) qualitativa como única ferramenta para a detecção dos herpesvirus nas amostras de tecidos ou em fluido crevicular (WU *et al.*, 2006; WATANABE *et al.*, 2007, CASSAI *et al.*, 2003). Considerando que os herpesvirus são ubíquos e podem permanecer de forma latente nas células do hospedeiro por toda a vida do indivíduo, é possível que PCR positiva em algumas amostras, possa indicar apenas infecção latente nestas células, o que poderia explicar a presença de DNA viral em áreas não-afetadas pela periodontite. Não é claro se a presença de genoma viral nas regiões afetadas por periodontite indicam influencia destes vírus nesta doença ou se são apenas indicativas de latência destes vírus em células que migraram para o local afetado, por ocasião da inflamação existente. Desta forma a influencia dos herpesvírus no desenvolvimento da periodontite é assunto discutível e esse campo ainda está sendo alvo de estudos.

## 1.7- Os herpesvírus humanos

### 1.7.1- Características gerais

Os herpesvírus humanos pertencem a família *Herpesviridae*, são vírus ubíquos e uma vez ocorrida a primo-infecção, permanecem no organismo do indivíduo afetado (latência) durante toda a vida. Estes vírus provocam uma grande variedade de doenças, sendo que, as infecções são frequentemente benignas, podendo, contudo, em indivíduos imunocomprometidos, causar manifestações clínicas de gravidade variada (FERREIRA & SOUSA, 2002; WAGNER & HEWLETT, 1999).

A família *Herpesviridae* está dividida em 3 sub-famílias: *Alphaherpesvirinae* ( $\alpha$ -herpesvirinae), *Betaherpesvirinae* ( $\beta$ -herpesvirinae) e a *Gammaherpesvirinae* ( $\gamma$ -herpesvirinae). Estas distinguem-se pelas suas características virais e estruturais, bem como pelo seu poder patogênico. Todos os tipos de vírus inseridos nesta família são vírus de DNA com cadeia dupla e os diferentes tipos de herpesvírus partilham características estruturais semelhantes. A Tabela 1 exhibe uma lista de vírus pertencentes ao grupo herpes que infectam humanos (FERREIRA & SOUSA, 2002, WAGNER & HEWLETT, 1999).

Os vírus do grupo herpes estabelecem infecções primárias com pouca sintomatologia, que podem resultar em resposta imunitária eficiente que impede uma nova infecção. Contudo, o vírus não é totalmente eliminado, sendo o seu genoma é mantido em determinadas células, sem que haja uma infecção produtiva. As infecções latentes podem tornar-se ativas (reativação) devido a fatores relacionados ao hospedeiro e estas manifestações permitem a disseminação dos herpesvírus, uma vez que se verifica libertação de vírions extracelulares (FERREIRA & SOUSA, 2002, WAGNER & HEWLETT, 1999 e MADIGAN *et al.*, 2000).

Os herpesvírus humanos simples tipo I e II (HSV-1 e HSV-2) estão usualmente associados com herpes labial e genital, respectivamente. Contudo, herpes genital pode ser uma consequência de infecção por HSV-1 e herpes labial pode também ser causado por HSV-2 (KONEMAN *et al.*, 2001). O herpesvirus humano tipo 3 (Varicela-Zoster) causa a varicela (catapora) na infecção primária que ocorre, especialmente, em crianças e a

reativação pode causar o aparecimento do zoster, herpes mais freqüente em idosos. Herpesvírus humano tipo 4 (Epstein-Barr vírus) é associado com mononucleose infecciosa, linfoma de Burkitt e carcinoma nasofaríngeo. Herpesvírus humano tipo 8 é associado ao sarcoma de Kaposi e pode levar a morte em pacientes imunossuprimidos, especialmente na síndrome de imunodeficiência adquirida (HIV/SIDA). A infecção primária por citomegalovírus causa uma síndrome parecida com a mononucleose conhecida como citomegalia ou “doença de inclusão citomegálica”. As infecções primárias por HHV-6 e HHV-7 causam uma síndrome infecciosa febril comum na primeira infância conhecida como exantema súbito ou roséola (WAGNER & HEWLETT, 1999).

**Tabela 1-** Vírus do grupo herpes que infectam humanos.

Vírus	Sinônimo	Sub-família	Abreviação
Herpesvírus Humano-1	Herpes simplex-1	$\alpha$	HSV-1/HHV-1
Herpesvírus Humano-2	Herpes simplex-2	$\alpha$	HSV-2/HHV-2
Herpesvírus Humano-3	Varicella-zoster	$\alpha$	VZV/HHV-3
Herpesvírus Humano-4	Epstein-Barr	$\gamma$	EBV/HSV-4
Herpesvírus Humano-5	Citomegalovírus	$\beta$	CMV/HHV-5
Herpesvírus Humano-6	Não há	$\beta$	HHV-6
Herpesvírus Humano-7	Não há	$\beta$	HHV-7
Herpesvírus Humano-8	Não há	$\gamma$	KSHV/HHV-8

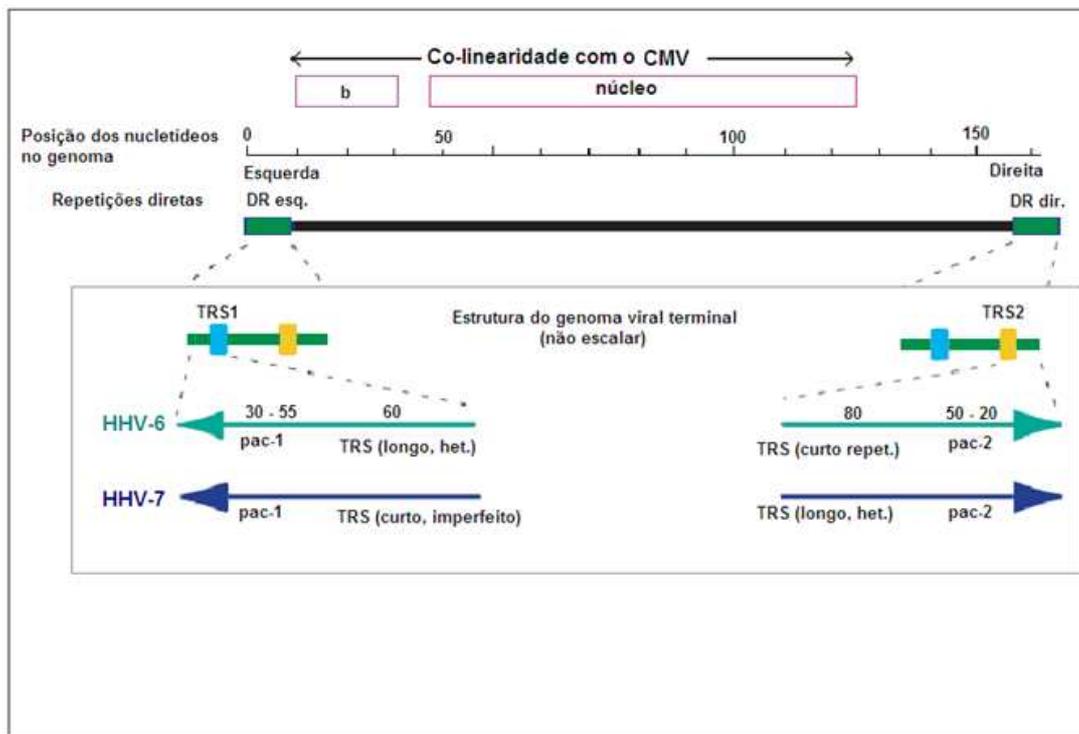
## 1.7.2- Betaherpesvírus

### 1.7.2.1- Classificação e epidemiologia

Os betaherpesvírus humanos de interesse médico pertencem à subfamília *Betaherpesvirinae* e incluem o CMV, HHV-6 e o HHV-7. Betaherpesvírus são ubíquos e epidemiologia para estes vírus pode variar dependente da região geográfica e de outras características da população estudada. A soroprevalência do CMV é largamente conhecida ao redor do mundo, enquanto que a soroprevalência do HHV-6 e HHV-7 são menos estudadas. Contudo, estima-se que a prevalência do HHV-6 e HHV-7 seja, também, alta (cerca de 90%) na maioria dos lugares (FREITAS *et al.*, 2004).

Em indivíduos imunocompetentes, as infecções primárias por betaherpesvírus são usualmente auto-limitadas, embora alguns casos de manifestações neurológicas tenham sido descritas especialmente em relação ao HHV-6 em crianças (DONATI *et al.*, 2003; MATSUMOTO *et al.*, 2011). Não está claro se as manifestações neurológicas são causadas pela invasão do tecido cerebral por este herpesvírus ou é um efeito indireto da infecção.

Após a infecção primária, os betaherpesvírus permanecem latentes no hospedeiro e podem reativar esporadicamente levando a viremia transitória. Embora, algumas síndromes (Ex. Síndrome da fadiga crônica e esclerose múltipla) tenham sido relacionadas com reativação herpesviral, o papel destes vírus nestas síndromes permanece ainda não esclarecido (DEWHURST, 2004). A Figura 1 mostra a organização estrutural do genoma dos betaherpesvírus humanos.



**Figura 1-** Organização estrutural do genoma do CMV, HHV-6 e HHV-7 (DEWHURST *et al.*, 1997).

### **1.7.2.2- Citomegalovírus**

As doenças causadas por CMV ocorrem em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento e a prevalência varia de 40 a 60% nos países do hemisfério norte, enquanto na África e na América Latina, taxas de 80-100% foram observadas (SUASSUNA *et al.*, 1995; COSTA *et al.*, 1999). Cerca de 80% da população entre o final da infância e início da adolescência já está infectado por CMV e podem abrigar o vírus em vários locais do corpo, especialmente nas glândulas salivares e em diferentes tipos de leucócitos. As células mononucleares do sangue periférico parecem ser o local mais comum para latência do CMV (ALMEIDA *et al.*, 2001).

Em adultos saudáveis, a infecção primária pelo CMV é geralmente assintomática. Alguns indivíduos podem ter sintomas semelhantes à síndrome de mononucleose infecciosa, como linfadenopatia, febre, exantema, mal-estar, artralgia, hepatomegalia e esplenomegalia. Em pacientes imunocomprometidos, a infecção pelo CMV pode modular a resposta imune e levar à apresentações clínicas mais complexas, incluindo a morte, dependente da situação envolvida (EMERY, 2001).

### **1.7.2.3- Herpesvírus humano 6**

Herpesvirus humano 6 (HHV-6) foi primeiramente isolado por SALAHUDDIN *et al.*(1986), de pacientes com doença linfoproliferativa e de síndrome da imunodeficiência adquirida.

No Brasil estudos de prevalência sorológica realizada nas regiões Norte e Sudeste mostram que anticorpos contra HHV-6 estavam presentes em 90% dos indivíduos na população estudada (0-40 anos) com a ocorrência da infecção primária, em geral, nos primeiros anos de vida (FREITAS *et al.*, 1997; LINHARES *et al.*, 1991).

Existem duas variantes distintas (HHV-6A e HHV-6B) com características genéticas, biológicas e imunológicas diferentes (SALAHUDDIN *et al.*, 1993).

O HHV-6B parece ser isolado mais freqüentemente do que o HHV-6A no sangue, exceto em pacientes com AIDS, enquanto HHV-6A foi obtido principalmente a partir de adultos com doenças crônicas (SALAHUDDIN *et al.*, 1993).

Cepas de HHV-6B foram na sua maioria isoladas de crianças com exantema súbito. Na maioria destes casos a infecção primária por HHV-6 apresenta sintomas como febre alta e erupção cutânea (*rash*). Convulsões também podem estar presentes nos casos mais graves. Infecção primária em adultos ainda não está totalmente caracterizada, mas uma variedade de condições clínicas têm sido descritas, incluindo desordens linfoproliferativas (FREITAS *et al.*, 2003).

A variante HHV-6A é a variante mais frequentemente encontrada em biópsias de linfonodo de pacientes infectados pelo HIV (FREITAS *et al.*, 2003).

A replicação do HHV-6 *in vivo* tem sido demonstrada em vários tipos celulares incluindo linfócitos, macrófagos, histiócitos, células endoteliais, células epiteliais. Linfócitos T-CD4<sup>+</sup> parecem ser as células-alvo principais para a infecção pelo HHV-6 (LUPPI *et al.*, 1998).

A ocorrência de antígenos e/ou DNA de HHV-6 em glândulas salivares, linfonodo, neurônios e células gliais sugere que HHV-6 pode, persistentemente, estabelecer latência nestas células e sofrer subsequente reativação. A saliva pode desempenhar um papel importante na transmissão horizontal do HHV-6 (FREITAS *et al.*, 2003).

#### **1.7.2.4- Herpesvírus humano 7**

HHV-7 foi isolado pela primeira vez a partir de células T-CD4<sup>+</sup> purificadas de um indivíduo saudável, por FRENKEL *et al.* (1990). O HHV-7, como outros betaherpesvirus, permanece latente ou em baixo nível de replicação viral após a infecção primária ou pode reativar durante estados de imunossupressão (IHIRA *et al.*, 2001).

No Brasil (região norte), 93 % de adultos e crianças maiores que 10 anos de idade apresentam anticorpos de classe IgG contra o HHV-7, segundo estudos de FREITAS *et al.* (2004). Assim como o HHV-6, este vírus pode também causar exantema súbito,

embora a primo-infecção pelo HHV-7 incide em idades entre 5 e 6 anos de vida, um pouco mais tarde que para o HHV-6, que ocorre aos 2 anos, aproximadamente (IOSHIKAWA *et al.*, 1989; WYATT *et al.*, 1992; TORIGOE *et al.*, 1995; TANAKA *et al.*, 1996; WARD *et al.*, 2001). A infecção pelo HHV-7 pode ocorrer mais cedo em regiões tropicais como o Brasil (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

HHV-7 compartilha muitas propriedades do HHV-6, sugerindo que os fatores que controlam a sua reativação ou aumento da replicação viral em pacientes imunodeprimidos podem ser semelhantes (MENDEZ *et al.*, 2001).

A exemplo do HHV-6, a transmissão horizontal do HHV-7 se dá, provavelmente, através da saliva como foi sugerido por TAKAHASHI *et al.* (1997). O índice de isolamento do HHV-7 a partir da saliva é muito alto, cerca de 75% (CANADA COMMUNICABLE DISEASE REPORT, 2000).

O receptor CD4 está presente em células das glândulas salivares, o que explica a alta frequência de isolamento deste vírus da saliva de seres humanos adultos sadios (KONEMAN *et al.*, 2001; WYATT & FRENKEL, 1992). Antígenos do HHV-7 são frequentemente encontrados em pulmões, pele, fígado, rins, glândulas mamárias e tonsila (KEMPF *et al.*, 1998).

Efeitos causados pelo HHV-7 em células de natureza imune tem sido descritos na literatura. HHV-7 infecta mais especificamente, as células T-CD4<sup>+</sup>, que pode resultar em citotoxicidade e atividades imunomodulatórias (SECCHIERO *et al.*, 2001). Também foi demonstrado que a “down” modulação da expressão de antígeno leucocitário humano (HLA) e beta-2-microglobulina pelo HHV-7 está ligada à replicação viral e não é apenas a consequência da interação de partículas virais com a superfície da célula. Células infectadas podem, portanto, eficientemente escapar da pressão imune do hospedeiro, que poderia explicar a persistência do HHV-7-células positivas em diversos tipos de tumores e doenças infecciosas crônicas (MIRANDOLA, 2006). Embora HHV-7 tenha tropismo restrito para células CD4<sup>+</sup>, deve-se notar que células T-CD4<sup>+</sup> infectadas por HHV-7 “matam” células T-CD8<sup>+</sup> não infectadas *in vitro*. Além disso, o HLA de classe I e beta-2-microglobulina são

também “down” modulados em células T-CD8<sup>+</sup> na presença de leucócitos infectados pelo HHV-7 *in vitro* (SECCHIERO *et al.*, 2001).

Em relação ao *HHV-7 in vivo*, existe pouca evidencia de manifestações graves causadas por ele. Os efeitos imunomodulatórios estão entre os mais pesquisados, embora, a relação causal com manifestações clínicas seja também difícil de estabelecer.

### **1.8- Relação dos betaherpesvírus humanos com periodontite**

Alguns autores sugeriram que a presença de herpesvírus em regiões periodontais poderia desempenhar um papel na patogênese da periodontite humana (CONTRERAS *et al.*, 2000; CASSAI *et al.*, 2003; ROTOLA *et al.*, 2008). Herpesvírus são ubíquos e após a infecção primária podem persistir de forma latente no hospedeiro em vários tipos de células, incluindo células do sistema imunológico. O citomegalovírus (CMV) é o membro mais estudado dos betaherpesvirus em regiões periodontais. Recentemente, outros dois betaherpesvirus (HHV-6 e HHV-7) têm sido investigados devido ao fato desses vírus serem freqüentemente detectados na saliva (CONTRERAS *et al.*, 2000; CASSAI *et al.*, 2003; ROTOLA *et al.*, 2008; CONTRERAS *et al.*, 2001). Betaherpesvirus também têm sido estudados após transplante de órgãos e alguns autores têm sugerido que os vírus podem agir direta ou indiretamente pela imunomodulação e influenciar a resposta imune devido à replicação viral em linfócitos e monócitos/macrófagos (HIRA *et al.*, 2001; MENDEZ *et al.*, 2001; FELDSTEIN *et al.*, 2003; PEIGO *et al.*, 2009).

Células inflamatórias abrigando herpesvírus presentes nos locais de inflamação periodontal podem contribuir para o desenvolvimento e evolução da periodontite (CONTRERAS *et al.*, 1999; KAMMA & SLOTS, 2003; SLOTS, 2007). CMV pode induzir efeitos citopáticos diretos sobre os fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais e células inflamatórias, polimorfonucleares, linfócitos T, macrófagos e, possivelmente, pode afetar células ósseas. Em pacientes com periodontite, as células T são ativadas e respostas específicas de linfócitos são movidos pela natureza do estímulo antigênico inicial. Este processo é apoiado por uma complexa cascata de eventos envolvendo citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios, que podem ser alterados devido à infecção

pelo CMV. Equilíbrio entre atividades pró-inflamatórias e anti-inflamatórias controladas por diferentes sub-populações de linfócitos parece ser crucial na patogênese da periodontite (SLOTS, 2010).

Considerando outros betaherpesvirus, a expressão de diferentes antígenos celulares pode ser drasticamente alterada em tecidos infectados por HHV-6 nos quais a infecção viral poderia induzir a “up ” regulação de CD4 e “down” modulação de CD3 nas células T. HHV-6 pode afetar gravemente a fisiologia de órgãos linfóides secundários através da infecção direta dos linfócitos T e modulação de receptores de membrana e de imunomoduladores de quimiocinas (GRIVEL *et al.*, 2003). Além disso, citotoxicidade e efeitos causados pela infecção por HHV-7 em subpopulações T-CD4<sup>+</sup> de linfócitos *in vitro* e *in vivo* têm sido descritos como um mecanismo adaptativo para a evasão do sistema imune do hospedeiro (SECCHIERO *et al.*, 2001).

Efeitos imunomoduladores locais causados pela infecção por herpesvirus pode facilitar a proliferação bacteriana e aumentar a virulência ou induzir a liberação de citocinas e quimiocinas a partir de células inflamatórias e tecido conjuntivo. Além disso, vírus e bactérias podem atuar em sinergismo para produzir patologia. Por outro lado, a presença de betaherpesvírus em regiões afetadas por periodontite poderia, meramente, refletir vírus latentes em células do tecido periodontal ou do infiltrado inflamatório presente neste tipo de patologia (SLOTS, 2007; SLOTS & CONTRERAS, 2000).

Uma vez que os linfócitos CD19<sup>+</sup> (B), CD3<sup>+</sup> (T) e as sub-populações auxiliares (T-CD4<sup>+</sup>) e citotóxicos (T-CD8<sup>+</sup>) estão envolvidos na patogênese da periodontite e essas células podem ser infectadas por herpesvírus, estudos para avaliar a associação de herpesvírus com sub-populações de células imunes no infiltrado inflamatório podem contribuir para esclarecer se existe interação entre vírus e o sistema imunológico na região periodontal. Entretanto, poucos estudos têm relatado associação entre a presença de herpesvírus com perfis imunofenotípicos de infiltrados inflamatórios (CONTRERAS *et al.*, 1999, SABETI *et al.*, 2009). Não é comum na literatura, a aplicação de métodos para a detecção de antígenos virais, como por exemplo a imuno-histoquímica, nas amostras afetadas por periodontite.

## *2- OBJETIVOS*

## **Gerais**

Determinar a prevalência de CMV, HHV-6 e HHV-7 em biópsias obtidas de pacientes afetadas por periodontite crônica marginal.

## **Específicos**

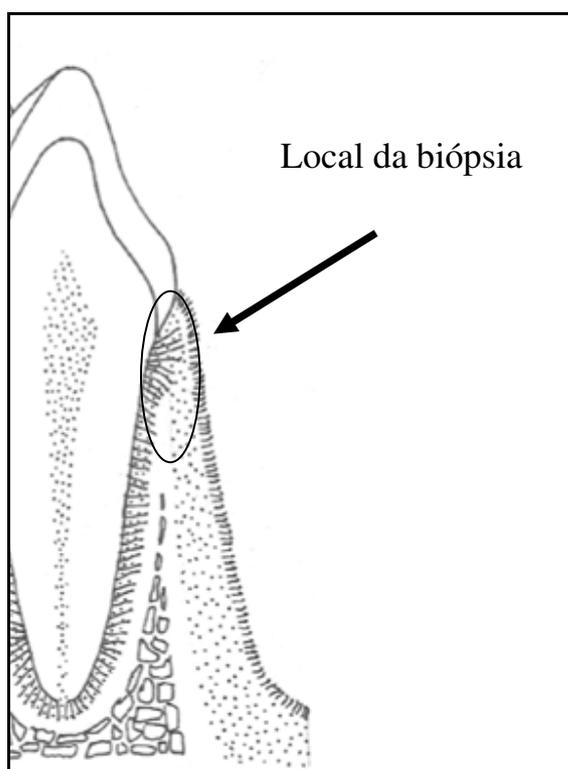
Determinar o perfil imunofenotípico do infiltrado inflamatório nas biópsias pela contagem de células CD19+ (B), CD3+ (T) e sub-populações T-CD4+ (T auxiliar) e T-CD8+ (citotóxico) e, verificar qual perfil imunofenotípico de infiltrado seria mais frequentemente associado à presença de CMV, HHV-6 e HHV-7.

*3- CASUÍSTICA E MÉTODOS*

### 3.1- Casuística

Vinte pacientes afetados por periodontite crônica foram incluídos neste estudo. Pacientes que apresentaram periodontite crônica marginal, com base nos achados clínicos e radiográficos (ARMITAGE, 1999) foram considerados elegíveis para participar deste estudo.

Todos os pacientes eram, sistemicamente, saudáveis e não receberam tratamento periodontal ou antibióticos, por pelo menos seis meses, antes do exame clínico e coleta das amostras. Cada paciente contribuiu com uma biópsia coletada da região clinicamente afetada envolvendo o epitélio e o tecido conjuntivo de frente para a “bolsa periodontal” e o sulco (CASSAI, 2003). A Figura 2 esquematiza a região do tecido na qual foram obtidas as biópsias.



**Figura 2** – Desenho esquemático do dente e periodonto mostrando a região do tecido na qual foram obtidas as biópsias (desenho adaptado de BRAGA *et al.*, 2007).

Em 12 indivíduos saudáveis (controle normal), amostras de tecido foram colhidas a partir de regiões periodontalmente saudáveis. Todos os indivíduos saudáveis apresentaram profundidade de sondagem  $\leq 3$  mm, sem perda de inserção ou sangramento gengival durante o procedimento de sondagem e as biópsias gengivais foram obtidas na região sulcular, durante o processo de extração de dente. Estes pacientes eram não-fumantes, sem periodontite ou gengivite, não eram portadores de doenças crônicas e não apresentavam indícios de infecções agudas.

A Tabela 2 exibe as características demográficas dos pacientes afetados por periodontite crônica e do grupo controle incluídos neste estudo.

O protocolo foi desenvolvido em conformidade com os requisitos para pesquisas envolvendo seres humanos, e foi aprovado pelo comitê de ética institucional. Além disso, todos os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido para serem incluídos neste estudo.

**Tabela 2-** Características clínicas e demográficas dos pacientes afetados por periodontite crônica e do grupo controle.

Grupo	Total n	Sexo (M/F)		Idade (anos)		PS (mm) Média	PCI (mm) Média
		N	(%)	Intervalo	Mediana		
Periodontite crônica	20	7/13	(35/65)	39-69	52	5,6	6,2
Grupo controle	12	6/6	(50/50)	20-40	34	--	--

PS= Profundidade de Sondagem; PCI= Perda Clínica de Inserção; mm= milímetros.

### 3.2- Métodos

Os fragmentos de tecido biopsiados foram lavados várias vezes com solução salina estéril e divididos em duas partes: uma delas foi fixada em formalina tamponada a 10% e outra congelada (-20°C) em frascos estéreis. Lâminas estéreis de bisturi e placas de Petri estéreis foram utilizadas para cada amostra, distintamente, para evitar contaminação cruzada.

Os fragmentos de tecido fixado em formalina foram destinados à análise imuno-histoquímica e para exame histopatológico. A extração do DNA foi realizada a partir do fragmento de tecido não fixado, no mesmo dia da amostragem (amostras mantidas à -20°C até o procedimento de extração).

### **3.2.1-Extração de DNA**

Os fragmentos de tecido foram finamente picados com a ajuda de lâmina de bisturi estéril (descartado a cada amostra) e incubados em tubos tipo *ependorf*, durante uma noite, a 56°C, com 100 µl de tampão de lise, contendo proteinase K (tampão Tris-HCl pH 8,3 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, 0,2% duodecil sulfato de sódio e 100 µg de proteinase K).

Aos tubos, foram adicionados 200 µl de mistura fenol-clorofórmio (na proporção de 1:1), homogeneizado por 15 segundos, em agitador mecânico e, posteriormente, centrifugado a 15.000 r.p.m., por 10 minutos, em centrífuga refrigerada à 10°C.

O sobrenadante foi removido para outro tubo. Este último processo foi repetido por mais duas vezes. Ao sobrenadante, foi adicionado 25µl de Acetato de Sódio 3M gelado e 900 µl de etanol absoluto. O tubo foi agitado e incubado em banho de gelo por 10 minutos.

O tubo foi centrifugado a 15.000 r.p.m. por 10 minutos, descartado o sobrenadante e o precipitado foi seco com os tubos invertidos protegidos da exposição à luz e de contaminantes por 8 horas. O precipitado foi ressuspensão em 25 µl de tampão-TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA). O DNA assim obtido foi mantido congelado à -20°C até o momento da análise (IMBRONITO *et al.*, 2008).

### **3.2.2-Reação em Cadeia da Polimerase (nested-PCR)**

As condições da reação seguiram a metodologia clássica da reação em cadeia da polimerase. As amplificações foram realizadas em um Peltier Thermal Cycler

(MJResearch, MA, EUA). Controles positivos e negativos para CMV, HHV-6 e HHV-7 foram incluídos de forma sistemática a cada bateria de reações.

### **3.2.3-Nested-PCR para CMV**

A nested-PCR seguiu o método descrito por DEMMLER *et al.*(1988) para CMV, com algumas modificações. O DNA extraído dos tecidos como descrito anteriormente foi processado na quantidade de 0,8 µL com 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 µM de cada desoxirribonucleotideo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2 pmol de cada iniciador (Tabela 3), e 0,5 U de Taq DNA Polimerase num total de 20 µL, usando água deionizada estéril q.s.p. A PCR foi realizada com uma desnaturação inicial de 94°C por 10 minutos, seguida de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C e, extensão final de 72°C por 10 minutos.

Uma segunda PCR foi realizada usando 0,6 µL do produto da primeira amplificação com 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 µM de cada desoxirribonucleotideo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2 pmol de cada iniciador (Tabela 3), e 1 U de Taq DNA Polimerase num total de 25 µL, usando água deionizada estéril q.s.p. As condições da segunda PCR foram: desnaturação inicial de 94°C por 10 minutos, seguida de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 57°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C e, extensão final de 72°C por 10 minutos.

### **3.2.4-Nested-PCR para HHV-6 (A/B)**

A nested-PCR seguiu o método descrito por SECCHIERO *et al.* (1995) para HHV-6, com algumas modificações. O DNA extraído dos tecidos como descrito anteriormente foi processado na quantidade de 2 µL com 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 µM de cada desoxirribonucleotideo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2 pmol de cada iniciador (Tabela 3), e 1 U de Taq DNA Polimerase num total de 25 µL, usando água deionizada estéril q.s.p.

A PCR foi realizada com uma desnaturação inicial de 94°C por 10 minutos, seguida de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 56°C e 1 minuto a 72°C e, extensão final de 72°C por 10 minutos.

Uma segunda PCR foi realizada usando 1 µL do primeiro PCR com 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 µM de cada desoxirribonucleotideo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2 pmol de cada iniciador (Tabela 3), e 1 U de Taq DNA Polimerase num total de 25 µL, usando água deionizada estéril q.s.p. A condições de reação da segunda PCR foram: desnaturação inicial de 94°C por 10 minutos, seguida de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 56°C e 1 minuto a 72°C e, extensão final de 72°C por 10 minutos.

### **3.2.5-Nested-PCR para HHV-7**

A nested-PCR para o HHV-7 seguiu o método descrito por POZO e TENORIO (1999) para HHV-7, com algumas modificações (originalmente, um multiplex-PCR). O DNA extraído dos tecidos como descrito anteriormente foi processado na quantidade de 5 µL com 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada desoxirribonucleotideo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10 pmol de cada iniciador (Tabela 3), e 1,25 U de Taq DNA Polimerase num total de 50 µL, usando água deionizada estéril q.s.p.

A PCR foi realizada com uma desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 53°C e 30 segundos a 72°C e, extensão final de 72°C por 5 minutos.

Uma segunda PCR foi realizada usando 1 µL do primeiro PCR e 49 µL de uma mistura consistindo de 60 mM Tris-HCl (pH 8,5), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada desoxirribonucleotideo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10 pmol de cada iniciador (Tabela 3) e, 1,25 U de Taq DNA Polimerase . As condições da reação seguiram as mesmas da PCR anterior, exceto que a temperatura de anelamento foi de 47°C.

**Tabela 3-** Sequência de bases dos iniciadores (*primers*) utilizados para a detecção do CMV, HHV-6 e HHV-7 e seus respectivos códigos de acesso ao *Genbank Database*.

<b>Iniciadores</b>	<b>Sequência de Bases</b>
CMV 1+ MIE-4	5' CCA AGC GGC CTC TGA TAA CCA AGC C 3'
CMV 1- MIE-5	5' CAG CAC CAT CCT CCT CTT CCT CTG G 3'
CMV 2+ IE-1	5' CCA CCC GTG GTG CCA GCT CC 3'
CMV 2- IE-2	5' CCC GCT CCT CCT GAG CAC CC 3'
Cod. Acesso: HS5MIE4	
<i>Major immediate early gene (MIE)</i>	
HHV-6 (A/B) 1+ EX-1	5' GCG TTT TCA GTC TGT AGT TCG GCA G 3'
HHV-6 (A/B) 1- EX-2	5' TGG CCG CAT TCG TAC AGA TAC GGA GG 3'
HHV-6 (A/B) 1+ IN-3	5' GCT AGA ACG TAT TTG CTG CAG AAC G 3'
HHV-6 (A/B) 1+ IN-4	5' ATC CGA AAC AAC TGT CTG ACT GGC A 3'
Cod. Acesso: X83413	
<i>Complete virion genome</i>	
HHV-7 1+	5' GAG GTG ATT TAT GGT GAT ACT GA 3'
HHV-7 1-	5' AAC TTT CCA ATG TAA CGT TTC TT 3'
HHV-7 2+	5' GTT ACT TTC AAA AAT GTT TGT CCC 3'
HHV-7 2-	5' GGA AAT AGG ATC TTT TCA AAT TC 3'
Cod. Acesso: U43400	
<i>Complete virion genome</i>	

### 3.2.6-Visualização dos produtos das nested-PCRs

A visualização das bandas foi realizada após a aplicação de 10 µl do produto da segunda PCR para cada um dos vírus em gel de Agarose a 2% em tampão TEB (TRIS-EDTA-BORATO), contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio e, submetida à eletroforese em imersão em tampão TEB por 15 minutos á 100 Volts. Após a corrida eletroforética, os géis foram visualizados à luz ultravioleta para a comprovação das bandas usando um padrão de peso molecular (DNA-Ladder, Gibco-BRL).

Os tamanhos das bandas separadas do CMV, HHV-6 (A/B) e HHV-7 são de 159, 258 e 122 pares de bases, respectivamente. PCR com iniciadores para gene da beta-globina foi realizada nas amostras de DNA extraídos dos tecidos como controle de qualidade para detectar possíveis falhas na técnica de extração (AQUINO, 2001).

### 3.2.7-Preparação e seccionamento dos tecidos

Os fragmentos de tecido foram mantidos por pelo menos 48 horas mergulhados em formalina tamponada a 10% para completa fixação.

Em seguida, os fragmentos de tecido foram desidratados pela incubação por 6 horas em soluções de álcool etílico a 50%, 70%, 90% e 100% sucessivamente.

Os fragmentos de tecido foram diafanizados por incubação em xilol puro por duas vezes em frascos distintos. Em seguida, os fragmentos foram incluídos em parafina histológica e emblocados.

Os blocos contendo fragmentos de tecidos foram seccionados em micrótomo (6  $\mu$ m) e as seções transferidas para lâminas pré-tratadas com silano (Sigma-Aldrich, MO, EUA) para evitar descolamento durante o processo de recuperação antigênica.

Para a coloração de Giemsa, foram utilizadas lâminas tratadas com albumina bovina para facilitar a aderência do tecido às lâminas.

As lâminas foram mantidas em estufa a 60°C, por pelo menos 24 horas, para completa secagem e estiramento do tecido nas lâminas.

As lâminas contendo os cortes de tecido foram desparafinados por imersão em xilol por duas vezes e reidratados por imersão em soluções de álcool etílico a 100%, 90%, 70%, 50% e lavados com PBS (tampão fosfato salino, pH 7,4).

### **3.2.8-Coloração de Giemsa**

As lâminas foram mergulhadas em corante de Giemsa, por 40 minutos e lavadas com água destilada, até desprendimento completo do excesso de corante. Após a secagem, as lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá e lamínula e mantidas ao abrigo da luz direta.

### **3.2.9-Recuperação antigênica**

A recuperação antigênica foi realizada por imersão e incubação das lâminas em tampão citrato (0,01 M de ácido cítrico, pH 6,0) a 96 ° C, por 50 minutos, em banho-maria.

As lâminas foram lavadas em água destilada, PBS e imediatamente submetidas à imuno-histoquímica, seguindo protocolo descrito abaixo.

### **3.2.10-Imuno-histoquímica para CD19, CD3, CD4 e CD8 (imunofenotipagem)**

As lâminas, contendo as secções de tecido, foram fixadas com solução de metanol-acetona gelada (1:1), por 15 minutos e, incubadas com albumina bovina a 1% (BSA) em PBS, por 15 minutos, para evitar a interferência por ligação inespecífica.

Os cortes de tecido foram cobertos com anticorpos monoclonais de camundongo fluorescentes (FITC-conjugado) (Biolegend, CA, EUA) contra CD19 humano (clone HIB19), CD3 (Clone HIT3a), CD4 (Clone RPA-T4) ou CD8 (Clone HIT8a) e incubados, por 2 horas, a 37 ° C, em câmara escura. As lâminas foram lavadas 3 vezes, com PBS e contra-coradas com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, 300nM in PBS), por 5 minutos, em câmara escura. As lâminas foram lavadas por várias vezes, com PBS, montadas com glicerina tamponada e imediatamente observadas ao foto-microscópio UV (DM2000 Leica, Wetzlar, Alemanha).

As células que apresentaram fluorescência específica de cor verde maçã foram consideradas positivas. Os núcleos das células apresentaram fluorescência de cor azul brilhante, após coloração com DAPI.

### **3.2.11-Imuno-histoquímica para citomegalovírus, HHV-6 e HHV-7**

As secções de tecido foram fixadas com solução de metanol-acetona gelada (1:1), por 15 minutos, e incubadas com albumina bovina a 1% (BSA), por 15 minutos, para evitar a interferência por ligação inespecífica. Os cortes histológicos foram cobertos com anticorpos monoclonais contra o citomegalovírus (C-10 e C-11, Biotest, Frankfurt, Alemanha), anticorpos monoclonais de camundongo contra o HHV-6 A/B (Mab8533 e Mab8535, Chemicon, Inc., Califórnia, EUA) ou para o HHV-7 (Mab-KR-4, Advanced Biotechnologies Inc., Maryland, EUA) e incubados, a 37 ° C, por 2 horas. Os cortes histológicos foram lavados três vezes, com PBS, e imersos em metanol contendo 0,3% de peróxido de hidrogênio, por 15 minutos, para bloquear a atividade da peroxidase endógena. Os cortes histológicos foram lavados três vezes, com PBS e, em seguida, cobertos com anticorpo de coelho anti-imunoglobulina de camundongo conjugado à peroxidase de rábano (HRP) (Z0456, Dako, Copenhagen, Dinamarca) e incubados a 37 ° C, por 1 hora. Os cortes

histológicos foram lavados três vezes com PBS e cobertos com anticorpo de cabra anti-imunoglobulina de coelho conjugado à peroxidase de rábano (HRP) (81-6120, Zymed, CA, EUA) e incubados, a 37 ° C, por 1 hora. Os cortes histológicos foram lavados em PBS e reação revelada pela incubação com amino-etil-carbazol contendo 0,03% de peróxido de hidrogênio, por 30 minutos no escuro.

Todas as etapas de incubação foram realizadas em câmara úmida. Finalmente, as secções de tecido foram lavadas com água destilada, contra-coradas com hematoxilina de Harris e montadas com bálsamo do Canadá. As células coradas em marrom foram consideradas positivas para antígenos virais. Tecidos positivos para citomegalovírus (biópsia de um paciente infectado pelo HIV com doença gastrointestinal pelo citomegalovírus) e tecido de paciente sem doença foram empregados para cada bateria de reação como controle de qualidade positiva e negativa para citomegalovírus, respectivamente. Linfonodo afetado por doença linfoproliferativa benigna e tonsila, que apresentavam células que expressavam antígenos (nested-PCR positivos) foram utilizados para cada bateria de reação como controle de qualidade positiva para HHV-6 e HHV-7, respectivamente. Linfonodo negativo (negativo por nested-PCR) e fígado de ratos foram utilizados como controle de qualidade negativa para ambos os vírus.

### **3.2.12-Análise morfológica e imuno-histoquímica**

Cada caso foi examinado por microscopia de luz após coloração pelo método de Giemsa, para a determinação da qualidade e intensidade do infiltrado. A intensidade do infiltrado foi graduada em *scores*: 0 = ausência de infiltração, 1 = infiltração discreta (poucas células inflamatórias próximas ao epitélio de junção), 2 = infiltração moderada (muitas células inflamatórias espalhadas por todo o tecido conjuntivo) e 3 = infiltração intensa (mais que 1/3 das células no tecido são células inflamatórias) (LIU *et al.*, 2006).

O número de células CD19<sup>+</sup> (B), CD3<sup>+</sup> (T) e sub-populações T-CD4<sup>+</sup> e T-CD8<sup>+</sup> foram obtidas por contagem da área total da lâmina. As áreas de infiltração inflamatória na lâmina foram focalizadas sob luz UV com aumento de 400x e células redondas positivas (fluorescência verde maçã) foram contadas. O total de núcleos foi contado na mesma área da lâmina através da fluorescência nuclear azul brilhante obtida após coloração com DAPI.

Todos os procedimentos de contagem foram realizados em triplicata. A porcentagem de células positivas foi calculada dividindo o número total de células positivas pelo número total de células redondas nucleadas e, multiplicado por 100. As relações de CD19<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> foram calculadas dividindo o número de células CD19<sup>+</sup> pelo número de células CD3<sup>+</sup> e, número de células CD4<sup>+</sup> pelo número de células CD8<sup>+</sup>, respectivamente.

As lâminas submetidas à imuno-histoquímica para CMV, HHV-6 e HHV-7 foram observadas por microscopia de luz e varridas em busca de células positivas (marrons) em suas áreas totais.

### **3.2.13-Análise estatística**

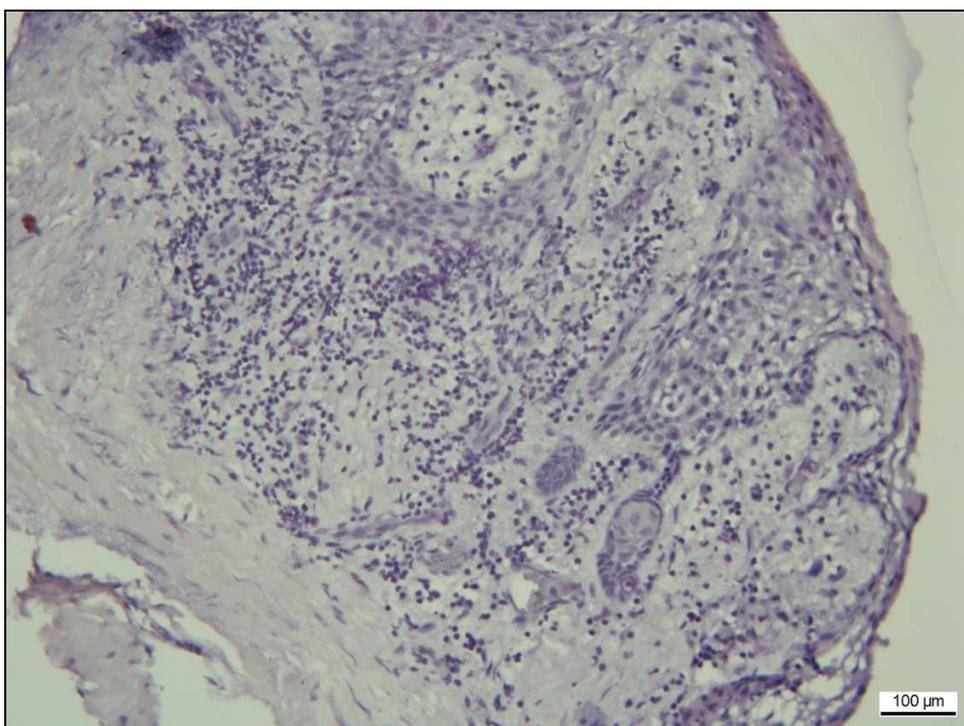
A análise estatística das variáveis contínuas foi realizada utilizando teste t pareado e a análise das variáveis categóricas foi realizada pelo teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Um valor de  $P \leq 0,05$  foi considerado, estatisticamente, significativo.

## ***4- RESULTADOS***

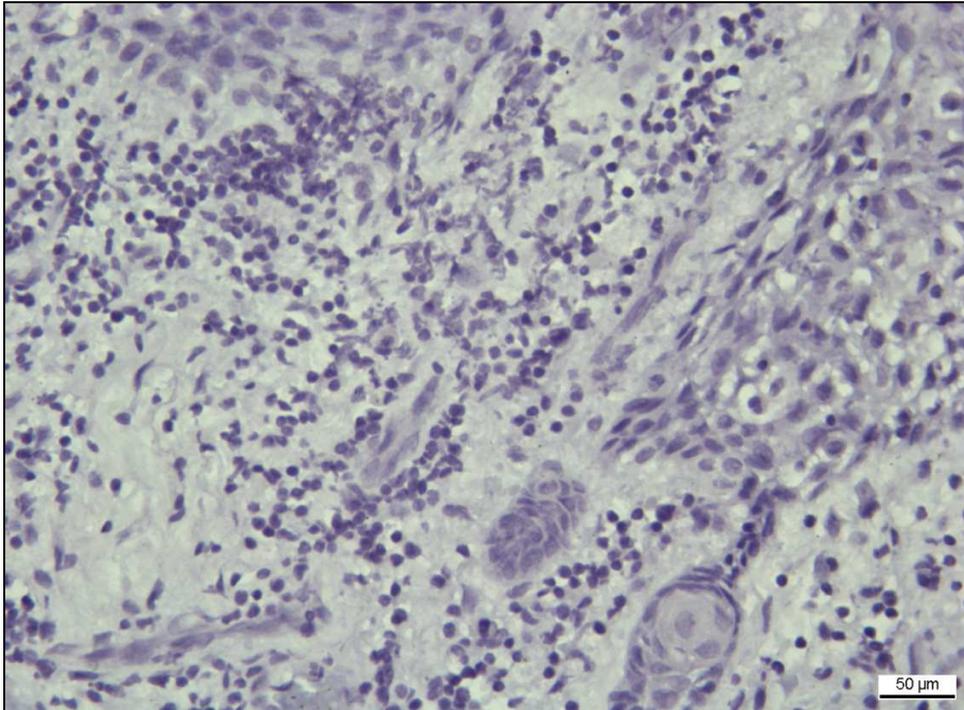
#### 4.1- Análise Morfológica

Todas as 12 amostras de tecido periodontal coletadas dos indivíduos do grupo controle não apresentaram infiltração inflamatória significativa e, portanto, foram excluídos dos procedimentos de imunofenotipagem.

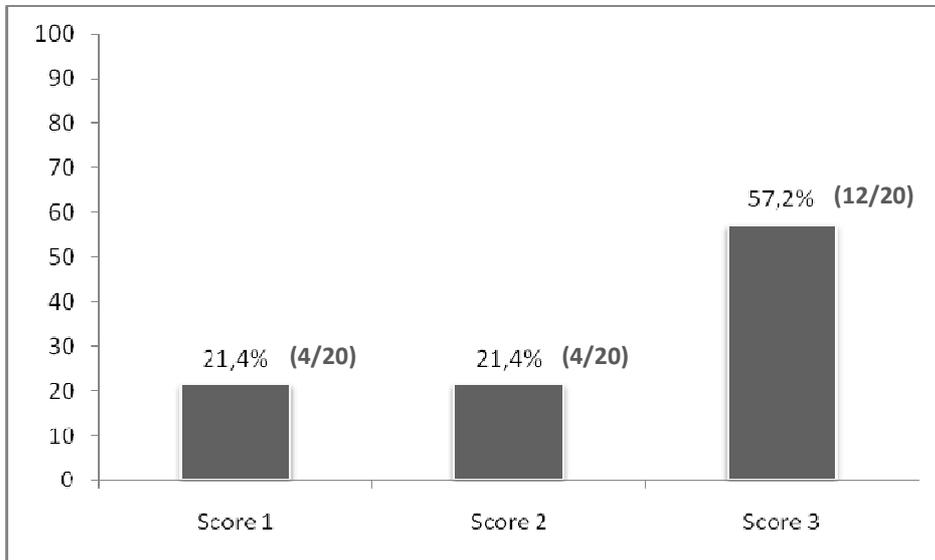
Dentre as 20 amostras de tecido periodontal coletadas dos pacientes afetados por periodontite, todas apresentaram infiltrado do tipo crônico com *escores* variando de 1 a 3. Figuras 3 e 4 exibem secções de tecido obtido de um paciente com periodontite apresentado infiltrado do tipo crônico corado pelo método de Giemsa. O Gráfico 1 exibe o percentual de cada *escore* de infiltração, onde foi verificado uma frequência de 57,2% do *score* 3 (12/20).



**Figura 3** – Secção de tecido afetado por periodontite crônica corado pelo método de Giemsa. Infiltrado crônico observado no tecido conjuntivo. Aumento de 100x.



**Figura 4-** A mesma preparação mostrada na Figura 3 em aumento de 400x.

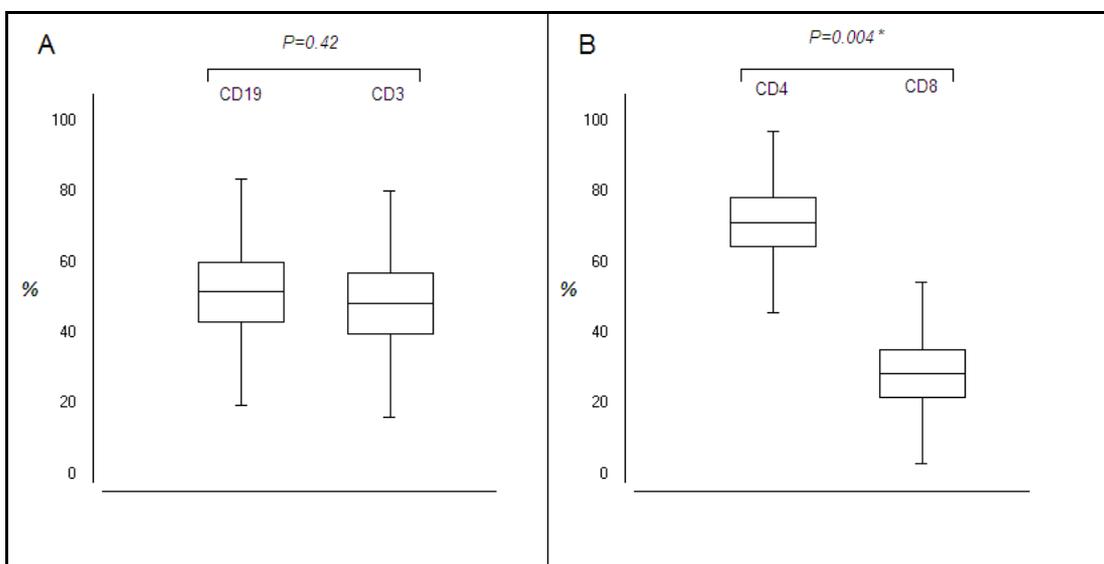


**Figura 5-** Distribuição das amostras afetadas por periodontite de acordo o nível de infiltração (*scores*). *Score 1*= infiltração discreta, *score 2*= infiltração moderada, *score 3*= infiltração intensa.

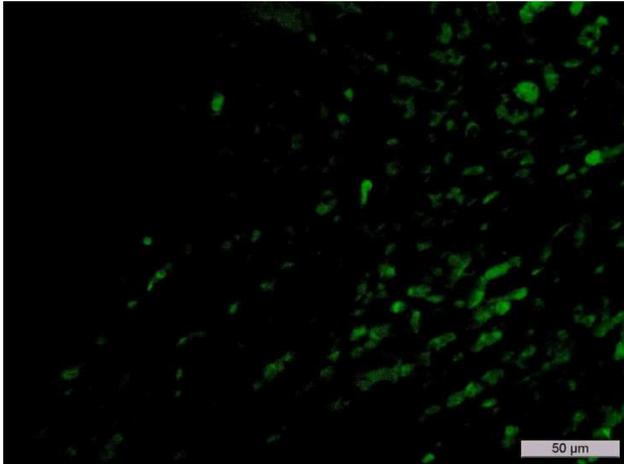
## 4.2- Imunofenotipagem

A avaliação da distribuição de cada marcador mostrou que células CD19<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> total e sub-populações T-CD4<sup>+</sup> e T-CD8<sup>+</sup> foram freqüentemente encontradas nos infiltrados de periodontite crônica embora em diferentes percentuais. Na maioria dos casos (60%), células CD19<sup>+</sup> (B) foram predominantes na amostra (relação CD19/CD3 > 1,1). Contudo, o número de células expressando CD19 não foi estatisticamente diferente do número de células expressando CD3 considerando o total de amostras (Gráfico 2A).

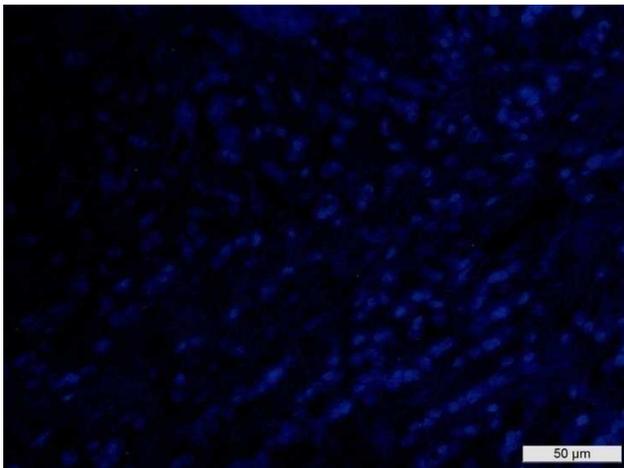
Em 9/20 (45%) pacientes, a sub-população de células T-CD4<sup>+</sup> foi predominante na amostra em relação ao T-CD8<sup>+</sup> (relação CD4/CD8 > 1,1). Nenhuma amostra apresentou predominância da sub-população de células T-CD8<sup>+</sup> sobre as células T-CD4<sup>+</sup>. O número absoluto de células expressando CD4 foi, significativamente, maior que o número de células expressando CD8 (P=0,004) considerando o total de amostras analisadas (Gráfico 2B). Fotomicrografia de uma amostra submetida à imunofenotipagem (marcação para o epítipo CD3) através da imunofluorescência direta está mostrada nas Figuras 5,6 e 7.



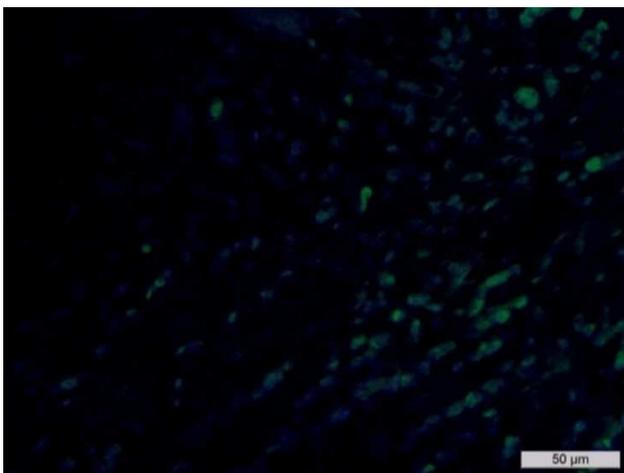
**Figura 6** – A- Frequências relativas de células CD19<sup>+</sup> (células B) e células CD3<sup>+</sup> (células T totais) no total de amostras obtidas de pacientes afetados por periodontite. Não foi observada diferença significativa entre estas duas populações celulares. B- Frequências relativas das sub-populações T-CD4<sup>+</sup> e T-CD8<sup>+</sup>. Predominância significativa de células CD4<sup>+</sup> sobre as células CD8<sup>+</sup> nas amostras (teste t pareado). “Whiskers” indicam o desvio padrão.



**Figura 7** – Tecido periodontal marcado com anticorpo monoclonal de camundongo anti-CD3 humano conjugado à fluoresceína (FITC). Aumento de 400x.



**Figura 8** - Núcleos celulares no mesmo campo visto na Figura 5 corado com DAPI.



**Figura 9** – Imagem combinada (sobreposta) das imagens mostradas nas Figuras 5 e 6.

### 4.3- Nested-PCR para CMV, HHV-6 e HHV-7

Foi detectado DNA do CMV em 30% dos pacientes com periodontite crônica (6/20), com ausência de amplificação em todos os pacientes controles (0/12). HHV-6 não foi detectado em nenhuma das amostras de pacientes com periodontite e foi detectado em apenas 1/12 amostras de indivíduos do grupo controle. Detectou-se DNA do HHV-7 em 30% dos pacientes com periodontite (6/20), com ausência de amplificação em todos os pacientes controles (0/12). CMV e HHV-7 foram, portanto, mais frequentes em amostras de região afetada pela periodontite que em amostras do grupo controle ( $P=0,04$  e  $P=0,04$ , respectivamente). A Tabela 4 mostra a frequência de cada herpesvirus estudado em cada grupo incluído neste estudo. CMV e HHV-7 não se correlacionaram com gravidade dos casos nem com profundidade de sondagem.

**Tabela 4-** Distribuição de CMV, HHV-6 e HHV-7 detectados por nested-PCR em biópsias coletadas de regiões afetadas por periodontite e de biópsias coletadas de tecido periodontal de indivíduos saudáveis (controle).

	<b>Afetados</b>	<b>Controle</b>	<b>P-valor</b>
	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	
<b>CMV</b>	6/20 (30)	0/12 (0)	0,04*
<b>HHV-6</b>	0/20 (0)	1/12 (5)	NS
<b>HHV-7</b>	6/20 (30)	0/12 (0)	0,04*

\* Teste exato de Fischer.

### 4.4- CMV, HHV-7 e características imunofenotípicas do infiltrado

CMV foi mais frequentemente encontrado nas amostras onde as células CD3<sup>+</sup> foram predominantes (relação CD19/CD3 < 0,9;  $P=0,003$ ). Nenhuma correlação foi encontrada entre CMV com células CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>.

HHV-7 foi também mais frequente onde as células CD3<sup>+</sup> foram predominantes nas amostras (relação CD19/CD3 < 0,9;  $P=0,003$ ). Além disso, HHV-7 foi associado com amostras onde a sub-população T-CD4<sup>+</sup> foi predominante (relação CD4/CD8 > 1,1;

P=0,002). Tabela 5 exibe a frequência de todos os vírus em cada diferente perfil de relação de CD19/CD3 e CD4/CD8 no total de amostras analisadas.

**Tabela 5-** Frequência de todos os vírus detectados por nested-PCR e distribuídos por perfil de marcador CD (relação) nas amostras analisadas.

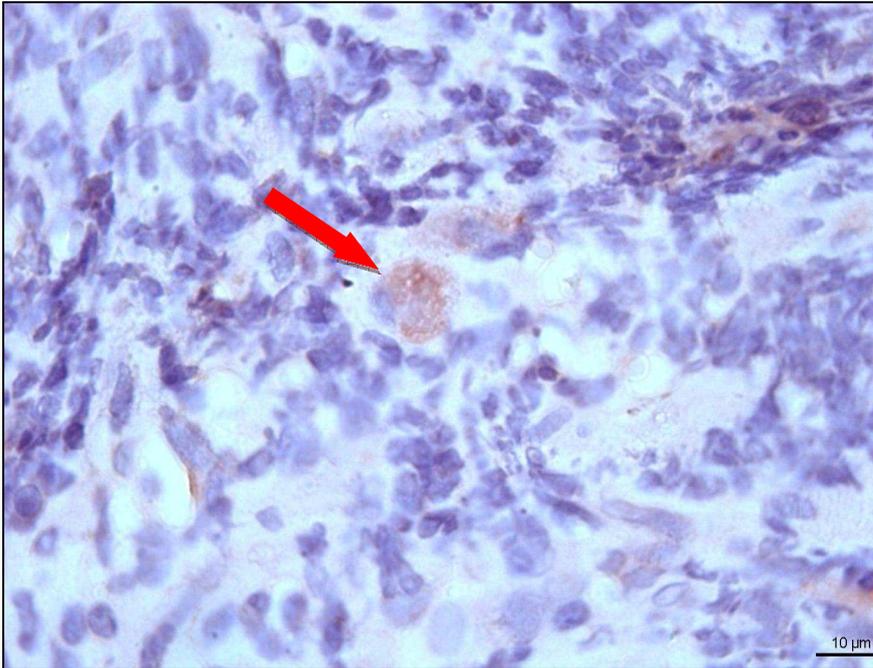
Marcador CD			CMV positivo			HHV-7 positivo		
	n	(%)	N	(%)	P-valor	N	(%)	P-valor
<b>Relação CD19/CD3</b>								
0,9 – 1,1	4/20	(20)	2/4	(50)	0,34	2/4	50	0,34
> 1,1	12/20	(60)	0/12	(0)	NS	0/12	0	NS
< 0,9	4/20	(20)	4/4	(100)	0,003*	4/4	100	0,003*
<b>Relação CD4/CD8</b>								
0,9 – 1,1	11/20	(55)	4/11	(36,3)	0,15	0/11	0	NS
> 1,1	9/20	(45)	2/9	(22,2)	0,66	6/9	100	0,002*
< 0,9	0/20	(0)	--	--	--	--	--	--

\* Teste exato de Fischer.

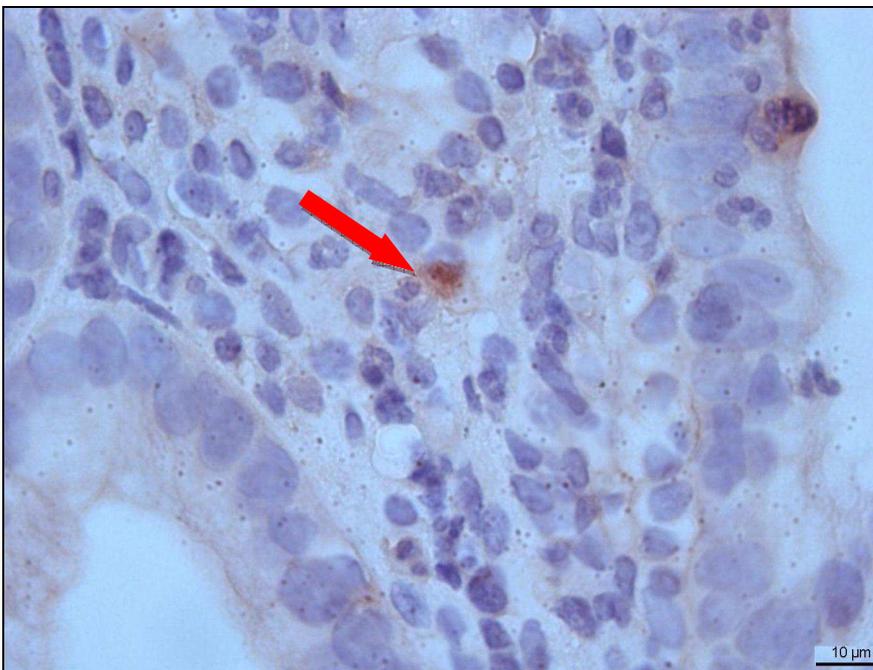
#### 4.5- Imuno-histoquímica para CMV, HHV-6 e HHV-7

Nenhuma das amostras de pacientes afetados por periodontite crônica nem do grupo controle foi positivo para qualquer dos vírus por imuno-histoquímica.

Reação positiva para CMV por imuno-histoquímica em fragmento de tecido biopsiado de um paciente infectado pelo HIV com doença gastrointestinal por CMV (usado como controle positivo) está mostrado nas Figuras 8 e 9. Imuno-histoquímica positiva para HHV-6 de linfonodo afetado por doença linfoproliferativa benigna usada como controle positivo está mostrado na Figura 10. Imuno-histoquímica positiva para HHV-7 em tonsila também usada como controle positivo esta exibida nas Figuras 11 e 12. Todos os controles negativos não revelaram qualquer célula positiva.



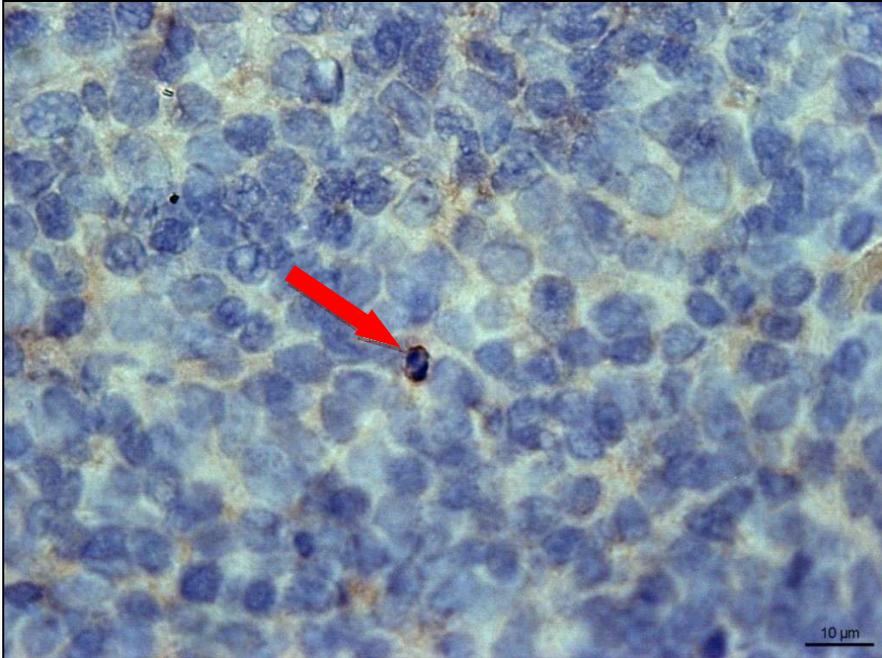
**Figura 10** – Secção de tecido biopsiado de um paciente HIV positivo afetado por doença gastrointestinal por citomegalovírus. Células positivas para antígenos de citomegalovírus por imuno-histoquímica coradas em marrom (controle positivo). Aumento de 400x.



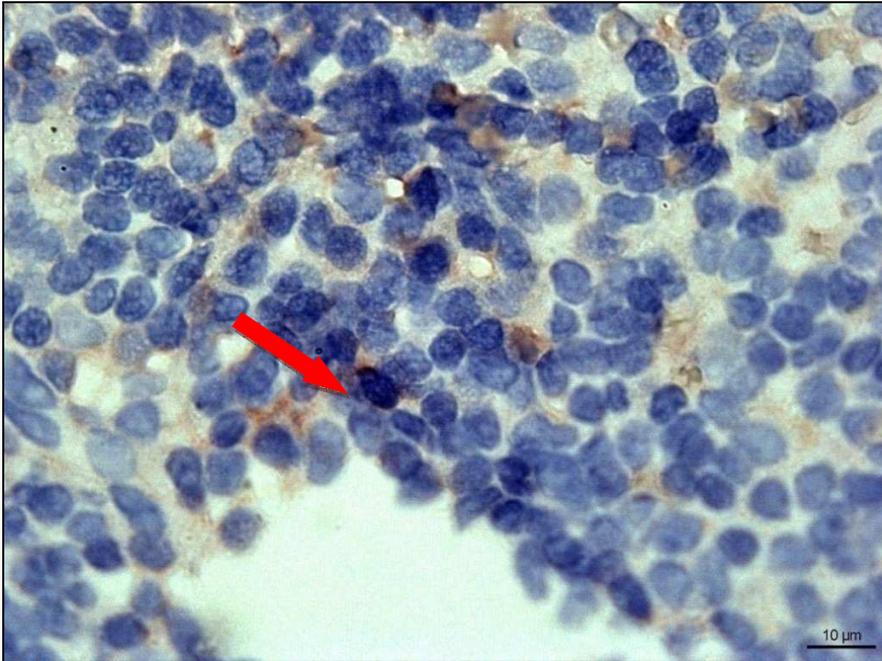
**Figura 11** – Mesma preparação mostrada na Figura 8 (outro campo) exibindo célula positiva para antígenos do CMV. Aumento de 400x.



**Figura 12-** Secção de linfonodo exibindo antígenos de HHV-6 em células positivas (coradas em marrom) revelados por imuno-histoquímica com anticorpos monoclonais contra HHV-6 A/B (provável monócito/macrófago). Aumento de 400x.



**Figura 13 -** Secção de tonsila exibindo célula positiva para antígenos de HHV-7 (coradas em marrom) revelado por imuno-histoquímica com anticorpos monoclonais contra HHV-7. Aumento de 400x.



**Figura 14** – Mesma preparação mostrada da Figura 11 (outro campo) exibindo célula positiva para antígenos do HHV-7. Aumento de 400x.

## *5- DISCUSSÃO*

A periodontite crônica é uma doença inflamatória onde um complexo de espécies bacterianas interage com o tecido do hospedeiro levando a inflamação. Esta inflamação pode levar a destruição das estruturas periodontais incluindo o tecido de sustentação do dente, osso alveolar e o ligamento periodontal culminando na perda dos dentes no indivíduo afetado (WU *et al.*, 2006).

Alguns estudos sugeriram que herpesvírus poderiam, também, desempenhar importante papel na patogênese da periodontite humana (CONTRERAS *et al.*, 2000; CASSAI *et al.*, 2003; ROTOLA *et al.*, 2008). Células inflamatórias abrigando herpesvírus presentes nos locais de inflamação periodontal podem contribuir para o desenvolvimento e evolução da periodontite (CONTRERAS *et al.*, 1999; KAMMA & SLOTS, 2003; SLOTS, 2007).

Neste estudo, tecido periodontal biopsiados de pacientes afetados por periodontite crônica e de indivíduos adultos sadios foram analisados para determinar o perfil imunofenotípico do infiltrado inflamatório e uma possível associação entre estes perfis e a presença de CMV, HHV-6 e HHV-7 nas amostras.

Imunofluorescência direta com anticorpos monoclonais anti-CD19, anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 marcados com FITC foi utilizada para a contagem de linfócitos B, linfócitos T totais e sub-populações T auxiliar e T citotóxica, respectivamente. Nested-PCR foi utilizada para detectar os genomas dos vírus CMV, HHV-6 A/B e HHV-7 e imuno-histoquímica (imuno-peroxidase), usando anticorpos monoclonais anti-CMV, anti-HHV-6 A/B e anti-HHV-7, foi usada para a detecção dos antígenos virais nas amostras.

Imuno-histoquímica para CMV foi padronizada e controlada a cada bateria de reação, utilizando tecido biopsiado de um paciente com doença gastrointestinal por CMV, previamente diagnosticado, histopatologicamente. Imuno-histoquímica para HHV-6 e HHV-7 foram padronizadas, usando linfonodo afetado por doença linfoproliferativa e tonsila positivos para este vírus, respectivamente. Há relatos na literatura que tecidos de linfonodos afetados por processos linfoproliferativos não-neoplásicos podem conter células expressando antígenos do HHV-6. Similarmente, células de diversos tecidos incluindo

tonsila podem apresentar raras células positivas para antígenos de HHV-7 (LUPPI *et al.*, 1998; KEMPF *et al.*, 1998).

Os resultados encontrados neste estudo demonstraram discreta predominância de células CD19<sup>+</sup> em regiões afetadas por periodontite, embora células CD3<sup>+</sup> tenham sido também frequentemente encontradas. NAKAJIMA *et al.* (34) encontraram predominância de células CD19<sup>+</sup> sobre células CD3<sup>+</sup> e, similarmente, YAMAZAKI *et al.* (11) encontraram predominância de células CD19<sup>+</sup>, embora, células CD3<sup>+</sup> foram também frequentes. Têm demonstrado que linfócitos T e B possuem papel significativo na progressão da periodontite. A conversão de uma lesão estável do tipo T para uma lesão progressiva do tipo B é, hipoteticamente, relacionada à fisiopatologia da periodontite. A conversão de gengivite para periodontite envolvendo diferentes fenótipos de infiltrado por células T têm sido também objetivo de estudos (YAMAZAKI *et al.*, 1995).

A sub-população T-CD4<sup>+</sup> foi significativamente predominante quando comparada a sub-população T-CD8<sup>+</sup>. NAKAJIMA *et al.* (2005) encontraram dominância de células CD19<sup>+</sup> sobre as células CD3<sup>+</sup> e similar dominância da sub-população T-CD4<sup>+</sup> nas amostras coletadas de periodontite crônica. YAMAZAKI *et al.* (1995) também encontraram dominância de células CD19<sup>+</sup>, embora as células CD3<sup>+</sup> foram encontradas em significativo número e, similar a este estudo, sub-população T-CD4<sup>+</sup> estava presente em maior número que a sub-população T-CD8<sup>+</sup>. Em contraste, CARDOSO *et al.* (2008) encontraram dominância de células CD3<sup>+</sup> e nenhuma diferença significativa entre os valores das sub-populações T-CD4<sup>+</sup> e T-CD8<sup>+</sup>. Diversas populações linfocitárias estão presentes na maioria dos casos neste estudo, embora as relações de CD19/CD3 e CD4/CD8 apresentaram-se variáveis.

Este estudo revelou que células B e T especialmente a sub-população T-CD4<sup>+</sup> foram importantes componentes do infiltrado, nos pacientes com periodontite crônica. Dados publicados por LIMA *et al.* (2011), considerando a sub-população T-CD4<sup>+</sup>, em periodontite crônica e agressiva, mostraram que a sub-população T-CD4<sup>+</sup> em periodontite crônica comumente expressam interleucina-4 (IL-4) e a sub-população T-CD4<sup>+</sup> de periodontite agressiva mais comumente expressam fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Isto significa que o padrão de citocinas pode ser diferente entre diferentes formas clínicas

da doença. Células T podem ser reservatórios comuns de betaherpesvirus, e este estudo revela que células T estão presentes em significativo número no infiltrado de periodontite crônica e, portanto, poderiam albergar herpesvirus ativos ou latentes.

Neste estudo, CMV e HHV-7 foram significativamente mais freqüentes em regiões afetadas por periodontite que em indivíduos sadios do grupo controle. Contudo, HHV-6 não foi encontrado com freqüência em ambos os tipos de indivíduos. Alguns autores têm demonstrado a presença de DNA do CMV em pacientes afetados por periodontite. Na população brasileira, CASARIN *et al.* (2010) encontraram 37-39,1% de positividade para CMV, por PCR, em indivíduos com diabetes tipo 2 e IMBRONITO *et al.* (2008) descreveram 50% de positividade em indivíduos não diabéticos. CHALABI *et al.* (2008) descreveram a presença de DNA viral do CMV em 59% dos pacientes, mas somente quando a profundidade de sondagem foi  $\geq 6$  mm. Neste estudo, não foi encontrada relação da profundidade de sondagem com a presença de CMV. BILICHODMATH *et al.* (2009) encontraram 26,3% de DNA do CMV em pacientes com periodontite crônica. GRENIER *et al.* (2009) e WATANABE *et al.* (2007) encontraram menores freqüências de 11% e 6% de DNA do CMV, respectivamente.

Poucos estudos na literatura descreveram a presença de DNA de HHV-6 e de HHV-7 em pacientes afetados por periodontite. CASSAI *et al.* (2003) não encontraram DNA do HHV-6 em regiões afetadas por periodontite e encontraram 10% em tecidos obtidos de indivíduos sadios demonstrando relativa similaridade com este estudo. CONTRERAS *et al.* (2000) descreveram 21% de positividade para DNA do HHV-6 em regiões afetadas, mas não incluíram indivíduos sadios ou tecido sadio do próprio indivíduo como controle. Somente uma amostra coletada de um indivíduo sadio foi positiva para DNA do HHV-6 neste estudo. É importante de se mencionar que o protocolo usado foi combinado com uma técnica de PCR para amplificação da beta-globina como controle interno para a qualidade da extração de DNA e presença de inibidores (SECCHIERO *et al.*, 1995; AQUINO & FIGUEIREDO, 2001).

Neste estudo, o DNA do HHV-7 foi detectado em 30% dos pacientes com periodontite e não foi detectado em indivíduos sadios. CONTRERAS *et al.* (2000) descreveram 43% de positividade para HHV-7 por PCR, em periodontite e, não detectou

DNA do HHV-7 em indivíduos saudáveis, sem periodontite. Outro estudo do mesmo autor (CONTRERAS *et al.*, 2001) descreveu 29% de pacientes positivos para HHV-7 sendo similar a este estudo. Em contraste, CASSAI *et al.* (2003) encontraram altas prevalências de DNA do HHV-7 em ambos indivíduos afetados e saudáveis (77% e 70%, respectivamente).

Naturalmente, para comparar os estudos, muitos fatores devem ser considerados como tipo e número de amostra, sensibilidade dos iniciadores (*primers*) usados para o PCR, presença de doença sistêmica, imunosenescência, origem étnica e se o paciente apresenta periodontite crônica ou agressiva. Adicionalmente, periodontites apicais e marginais deveriam ser consideradas separadamente uma da outra.

Embora, a presença de betaherpesvirus relacionados com perfil de infiltrado inflamatório em regiões afetadas por periodontite tenha sido documentada (CONTRERAS *et al.*, 1999; SABETI *et al.*, 2009), existem dados controversos na literatura e esta associação precisa ser melhor documentada.

A associação de herpesvirus com a sub-população de células imunes poderia ajudar a entender se existe e, quais tipos de envolvimento estes vírus poderiam ter com periodontite humana.

CONTRERAS *et al.* (1999) encontraram que, em 20% das biópsias obtidas de regiões afetadas por periodontite, células CD3<sup>+</sup> T albergavam CMV, e células CD3<sup>+</sup> T de gengivas saudáveis não albergavam este vírus. SABETI *et al.* (2009) também encontraram CMV em células CD3<sup>+</sup> T em 54% de lesões periapicais.

Embora, hipoteticamente, células T-CD4<sup>+</sup> são o alvo principal para a infecção por HHV-7 no infiltrado inflamatório de periodontite crônica, não existem ainda dados científicos que possam validar esta hipótese.

Este estudo teve como objetivo principal avaliar presença de betaherpesvirus em associação com o perfil fenotípico e o número de cada sub-população linfocitária no infiltrado inflamatório. CMV foi correlacionado com amostras que apresentaram predominância de células CD3<sup>+</sup> e, HHV-7 foi correlacionado com amostras nas quais

ocorreu predominância da sub-população de células T-CD4<sup>+</sup>. Considerando as associações observadas entre CMV com a predominância de células CD3<sup>+</sup> e HHV-7 com a predominância células T-CD4<sup>+</sup>, estes dois vírus poderiam atuar como co-fatores modulando a atividade destas células. A liberação de diferentes tipos de citocinas e ativação de linfócitos B orquestrados por linfócitos T têm sido relatados como importantes características do processo inflamatório periodontal (CARDOSO *et al.*, 2008, YAMAZAKI *et al.*, 1995). Células T-reg (T regulatórias CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) podem estar envolvidas na modulação da resposta imune local em paciente com periodontite crônica (CARDOSO *et al.*, 2008). Células infectadas por vírus sofrem mudanças levando à “up” ou “down” regulação de diferentes fatores que poderiam contribuir para a patogênese do processo inflamatório (GRIVEL *et al.*, 2003; SECCHIERO *et al.*, 2001; CONTRERAS *et al.*, 2000; CASSAI *et al.*, 2003; ROTOLA *et al.*, 2008).

O CMV tem potencial de suprimir, indiretamente, a função de células T citotóxicas antígeno-específicas. Isto pode causar decréscimo no número de células T-CD8<sup>+</sup>, levando ao decréscimo de funções imunes mediadas por células através da infecção de outras células presentes no tecido periodontal que liberam citocinas que agem sobre as células T-CD8<sup>+</sup>. Efeito imunossupressivo que envolve dano direto aos linfócitos induzindo a produção de auto-anticorpos e mediadores inflamatórios tem sido descritos (CONTRERAS *et al.*, 1999). Neste estudo, não foi encontrada correlação entre sub-populações linfocitárias específicas (CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>) com CMV, possivelmente devido ao fato que este vírus pode infectar diferentes tipos de células como monócitos/macrófagos, células dendríticas, células epiteliais, fibroblastos e células endoteliais (SABÓIA-DANTAS *et al.*, 2007) as quais podem estar presentes no tecido periodontal.

O HHV-7 infecta mais especificamente células T-CD4<sup>+</sup> o que pode resultar em citotoxicidade e atividade imunomodulatória no indivíduo hospedeiro (SECCHIERO *et al.*, 2001). Tem sido também demonstrado que, “down” modulação da expressão de antígeno leucocitário humano (HLA) e de beta-2-microglobulina pelo HHV-7 está ligada com a replicação viral e não é meramente a consequência da interação dos vírions com a superfície celular. Células infectadas podem, portanto, eficientemente escapar da pressão

imune do hospedeiro e esse fato poderia explicar a persistência de células HHV-7 positivas em diferentes tipos de tumores e doenças infecciosas crônicas (MIRANDOLA *et al.*, 2006).

Embora, o HHV-7 tenha tropismo restrito a células CD4<sup>+</sup>, é importante ressaltar que células T-CD4<sup>+</sup> infectadas por HHV-7 destroem células T-CD8<sup>+</sup> não infectadas *in vitro*. Além disso, HLA de classe I e beta-2-microglobulina são também “down” moduladas em células T-CD8<sup>+</sup>, na presença de leucócitos infectados por HHV-7 *in vitro* (SECCHIERO *et al.*, 2001). Neste estudo, foram encontrados baixos valores de células T-CD8<sup>+</sup> comparadas às células T-CD4<sup>+</sup> nas amostras e isto poderia ser resultado da infecção ou imunomodulação por CMV e/ou HHV-7 nas células do hospedeiro.

Um modelo chamado de “patógeno bacteriano-herpesviral” foi proposto no qual a infecção herpesviral poderia facilitar a proliferação e virulência bacteriana ou induzir a liberação de citocinas e quimiocinas a partir das células inflamatórias e do tecido conjuntivo (SLOTS *et al.*, 2003, SLOTS, 2007).

Efeitos citopáticos, evasão imune, imunopatogenicidade, latência, reativação e tropismo celular são aspectos importantes relacionados aos herpesvírus considerando periodontite. Infecção herpesviral causa liberação de citocinas pró-inflamatórias que poderiam ativar linfócitos T e osteoclastos (SLOTS, 2009). Desde que células CD3<sup>+</sup> e sua sub-população T-CD4<sup>+</sup> podem albergar CMV e/ou HHV-7, estes vírus poderiam ter algum papel na patogênese da periodontite crônica. Contudo, as amostras obtidas não apresentaram expressão de antígenos virais para qualquer um dos vírus por imuno-histoquímica, em qualquer um dos tecidos: epitélio, tecido conjuntivo e células inflamatórias. Usualmente, expressão de antígenos virais não ocorre em significantes níveis em estado de latência e não seria detectada através de imuno-histoquímica.

Relativamente, poucos estudos baseados na detecção de antígenos virais (SABÓIA-DANTAS *et al.*, 2007; SABETI *et al.*, 2009), análises de transcrição de RNA viral e PCR quantitativo (BOTERO *et al.*, 2008) tem sido descritos. A presença de antígenos, transcrição de RNA viral e altos números de cópias de DNA viral (carga viral) nas amostras seriam mais associados à presença de infecção ativa que positividade por métodos de PCR qualitativos.

Sabóia-Dantas et al. (2007) demonstraram 67% de positividade para antígenos de CMV em periodontite apical em pacientes HIV positivos, mas somente 8% em lesões de pacientes HIV negativos. SUNDE *et al.* (2008) não encontraram antígenos de CMV em amostras de periodontite apical. SABETI *et al.* (2009) encontraram 67% de pacientes positivos para CMV por citometria de fluxo, mas também em periodontite apical. Não há relatos na literatura considerando HHV-6 e/ou HHV-7 em periodontite marginal analisados por imuno-histoquímica até o presente momento. A maioria dos estudos consideram PCR, geralmente nested-PCR como principal método de detecção de HHV-6 e HHV-7 nos tecidos ou no fluido crevicular.

PCR qualitativa (como nested-PCR) tem recebido muitas críticas quando usada para diagnóstico de agentes virais que potencialmente causam infecção latente em seus hospedeiros. A alta sensibilidade da PCR poderia detectar baixo número de cópias de DNA viral em células albergando vírus em estado de latência.

A alta sensibilidade da PCR em detectar DNA viral em células com infecção latente poderia explicar a presença de CMV e HHV-7 nas amostras. A correlação de CMV com células CD3<sup>+</sup> e células T-CD4<sup>+</sup> encontrada neste estudo poderia ser meramente uma consequência de uma maior probabilidade de detecção de vírus em infiltrados com maior predominância de células que são naturalmente reservatórios destes vírus em indivíduos com infecção latente. A menor quantidade de células inflamatórias presentes em regiões periodontais saudáveis também explicaria a baixa taxa de detecção dos vírus em indivíduos saudáveis. Contudo, esta hipótese não explicaria a baixa taxa de detecção de HHV-6 em ambos os grupos devido ao fato de HHV-6 ser altamente prevalente na população mundial incluindo o Brasil e possuem as mesmas células reservatório.

CMV e HHV-7 podem se reativar periodicamente e suas partículas virais serem eliminadas na saliva (IHIRA *et al.*, 2003). HHV-7 é liberado na saliva de aproximadamente 90% dos indivíduos saudáveis e pode ser detectado em DNA extraído de leucócitos de sangue periférico de indivíduos saudáveis em 28,3% dos casos (THOMASINI *et al.*, 2008). Embora, neste estudo, os fragmentos biopsiados tenham sido lavados várias vezes com salina estéril para remover saliva e restos de alimentos nos tecidos, a hipótese de contaminação das amostras com saliva não pode ser completamente descartada.

Os controles positivos para imuno-histoquímica para todos os vírus forneceram os resultados esperados e, portanto, poderia se esperar condições adequadas de reação. No entanto, a não detecção dos antígenos virais devido a fatores que não puderam ser controlados e que, eventualmente, poderiam levar a resultados falso-negativos não pode ser também, completamente, descartada.

Embora, a infecção latente com infiltrado inflamatório periodontal crônico albergando CMV e HHV-7 inativos seja a hipótese mais provável, estes dados precisam ser avaliados com muito cuidado. Em primeiro lugar, outros métodos de detecção deveriam ser utilizados para confirmar os achados deste estudo como “Western Blot” para detectar antígenos virais ou hibridização *in situ* para RNA viral nas amostras.

CMV e HHV-7 podem se reativar transitória e intermitentemente no hospedeiro e, uma única amostra negativa para antígenos virais não exclui a possibilidade de vírus ativos ter ocorrido em algum momento. Infecção latente pode ser uma infecção eficientemente controlada pelo sistema imune e as características desta condição não são ainda completamente conhecidas. Embora seja pouco provável, mesmo em latência estes vírus poderiam atuar como co-fatores em menor grau por mecanismos ainda desconhecidos.

Determinação da carga viral por “real-time PCR”, imunofluorescência dupla para detecção simultânea de CD e antígenos virais, citometria de fluxo, bem como, outros anticorpos monoclonais poderiam ser testados. Avaliação de imunidade celular mais apurada também poderia ajudar a compreender a natureza da resposta imune na periodontite crônica.

## *6- CONCLUSÃO*

- CMV e HHV-7 estão presentes em regiões afetadas por periodontite crônica, mas foram incomuns no grupo controle.
- HHV-6 foi incomum tanto em regiões afetadas por periodontite como no grupo controle.
- Os dados sugerem que CMV pode estar relacionado a infiltrado inflamatório com predominância de células CD3<sup>+</sup> (T) e, HHV-7 pode estar relacionado com infiltrado com predominância de células T-CD4<sup>+</sup>.
- CMV e HHV-7 podem possuir algum papel na patogenia da periodontite crônica através de modulação de células T. Contudo, outros métodos são necessários para confirmar esta hipótese.

***7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

ALMEIDA LNB, AZEVEDO RS, AMAKU M, MASSAD, E. Cytomegalovirus seroepidemiology in an urban community of São Paulo, Brazil. *Rev Saúde Pub*; 35: 124-129, 2001.

AMANO A, MURAKAMI J, AKIYAMA S, MORISAKI I. Etiologic factors of early-onset periodontal disease in Down syndrome. *Japanese Dental Science Review*; 44(2): 118-127, 2008.

AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. The pathogenesis of periodontal diseases. *J Periodontol*; 70: 457-470, 1999.

ANAND PS, NANDAKUMAR K. Management of periodontitis associated with endodontically involved teeth: a case series. *J Contemp Dent Pract*; 6(2):118-129, 2005.

AQUINO VH, FIGUEIREDO LTM. Cytomegalovirus infection in renal transplant recipients diagnosed by Nested-PCR. *Braz J Med Biol Res*; 34: 93-101, 2001.

ARMITAGE GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontl*; 4: 1-6, 1999.

BAILLEUL-FORESTIER I, MONOD-BROCA J, BENKERROU M, MORA F, PICARD B. Generalized periodontitis associated with Chédiak-Higashi syndrome. *J Periodontol*; 79(7):1263-1270, 2008.

BEEN V, ENGEL D. The effects of immunosuppressive drugs on periodontal inflammation in human renal allograft patients. *J Periodontol*; 53(4):245-248, 1982.

BILICHODMATH S, MANGALEKAR SB, SHARMA DCG, PRABHAKAR AK, REDDY SB, KALBURGI NB. Herpesvirus in chronic and aggressive periodontitis patients in an Indian population. *J Oral Sci*; 51: 79-86, 2009.

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*; 43(6):649-57, 2008.

BRAGA FSFF, LETÍCIA MIRANDA LA, MICELI VC, AREAS A, FIGUEREDO CMS, FISCHER RG, MARQUES AFGS, CAMPOS LL, FLAVIO SZTAJNBOK FS. Chronic arthritis and periodontitis *Rev Bras Reumatol*; 47(4), 116-118, 2007.

CANADA COMUNICABLE DISEASE REPORT. Expert Working Group on HHV-6 and 7 Laboratory Diagnosis and Testing; 26(S4), 2000.

CARDOSO CR, GARLET GP, MOREIRA AP, MARTINS JUNIOR W, ROSSI M A, SILVA JS. Characterization of CD4+ CD25+ natural regulatory T cells in the inflammatory infiltrate of human chronic periodontitis. *J Leukoc Biol*; 84: 311-318, 2008.

CARRANZA F.A., NEWMAN, 1996. M.G. *Periodontia Clínica*, 8 Ed., Editora. Guanabara Koogan.

CASARIN RCV, DUARTE PM, SANTOS VR, LIMA JA, GAGNON G, CASATI MZ, *et al.* Influence of glycemic control and Epstein-Bar and Cytomegalovirus infection in periodontal pocket of type 2 diabetic subjects. *Arch Oral Biol*; 55: 902-906, 2010.

CASSAI E, GALVAN M, TROMBELLI L, ROTOLA A. HHV-6, HHV-7, HHV-8 in gingival biopsies from chronic adult periodontitis patients. *J Clin Periodontal*; 30: 184-191, 2003.

CHALABI M, MOGHIN S, MOGHAREHABED A, NAJAFI F, REZAIIE F. EBV and CMV chronic periodontitis: a prevalence study. *Arch Virol*; 153: 1917-1919, 2008.

CIMASONI G. Crevicular fluid updated. *Monogr Oral Sci*; 12:1-152, 1983.

CONTRERAS A, NOWZARI H, SLOTS J. Herpesvirus in periodontal pocket and gingival tissue specimens. *Oral Microbiol Immunol*; 15: 15-18, 2000.

CORDEIRO MCB. Necrosante periodontal disease: ulcerative gingivitis necrosante – case report, *RSBO*; 1(1): 30-35, 2004.

COSTA SCB, MIRANDA SRP, ALVES G, et al. Detection of cytomegalovirus infection by PCR in renal transplant patients. *Braz. J. Med. Biol. Res*; 32:953-959, 1999.

CONTRERAS A, MADIROSSIAN A, SLOTS J. Herpesviruses in HIV-periodontitis. *J Clin Periodontol*; 28: 96-102, 2001.

CONTRERAS A, UMEDA M, CHEN C, BAKKER I, MORRISON JL, SLOTS J. Relationship between herpesvirus and adult periodontitis and periodontopathic bacteria. *J Periodontol*; 70: 478–484, 1999.

DEMMLER GJ, BUFFONE CJ, SCHIMBOR CM, et al. Detection of cytomegalovirus in urine newbornes by using polymerase chain reaction DNA amplification. *J Infect Dis*; 158:1177-1184, 1988.

DESCHNER J, HAAK T, JEPSEN S, KOCHER T, MEHNERT H, MEYLE J, SCHUMM-DRAEGER PM, TSCHÖPE D. Diabetes mellitus and periodontitis. Bidirectional relationship and clinical implications. A consensus document. *Internist (Berl)*; 52(4):466-77, 2011.

DONATI D, AKHYANI N, FOGDELL-HAHN A, CERMELLI C, CASSIANI-INGONI R, VORTMEYER A, HEISS JD, COGEN P, GAILLARD WD, SATO S, THEODORE WH, JACOBSON S. Detection of Human Herpesvirus-6 in Mesial Temporal Lobe Epilepsy Surgical Brain Resections. *Neurol*; 61:1405–1411, 2003.

DEWHURST S. Human herpesvirus type 6 and human herpesvirus type 7 infections of the central nervous system. *Herpes*; 11:105-111, 2004.

DEWHURST S, SKRINCOSKY D, VAN LOON N. Human herpesvirus 7. *Exp Rev Mol Med*; 1:1-12, 1997.

EMERY VC. Human Herpesvirus 6 and 7 in solid organ transplant recipients. *Clin Infect Dis*; 32:1357-1360, 2001.

ENWONWU CO, PHILLIPS RS, FALKLER WA JR. Nutrition and oral infectious diseases: state of the science. *Compend Contin Educ Dent*; 23(5):431-448, 2002.

FELDSTEIN AE, RR RAZONABLE, TG BOYCE, et al. Prevalence and clinical significance of human herpesvirus 6 and 7 active infection in pediatric liver transplant patients. *Pediatr Transp*; 7: 125-129, 2003.

FERREIRA W, SOUSA J, 2002. *Microbiologia – volume III*. Lidel – edições técnicas, Ltda; Lisboa, Portugal.

FLEMMIG TF, Periodontitis. *Ann Periodontol*; 4:32-7, 1999.

FREITAS RB, LINHARES AC, Prevalence of human herpesvirus 6 antibody in the population of Belem, Para, northern Brazil. *Trans Royal Soc of Trop Med Hyg*; 91:538-540, 1997.

FREITAS RB, FREITAS MR, LINHARES AC. Evidence of active herpesvirus 6 (variant-A) infection in patients with lymphadenopathy in Belém, Pará, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*; 45(5):283-288, 2003.

FREITAS RB, FREITAS MR, OLIVEIRA CS, et al. Human herpesvirus-7 as a cause of exanthematous illnesses in Belém, Pará, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*. 46(3):139-143, 2004.

FRENKEL N, SCHIRMER EC, WYATT IS. Isolation of a new herpesvirus from human CD4 T cells. *Proc Nat Acad Sci United States of America*; 87:748, 1990.

GREENSTEIN G. The role of bleeding upon probing in the diagnosis of periodontal disease. A literature review. *J Periodontol*; 55:684-688, 1984.

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*; 24: 506-509, 2009.

GRIVEL JC, SANTORO F, CHEN S, FAGÁ G, MALNATI MS, ITO Y, et al. Pathogenic effects of human herpesvirus 6 in human lymphoid tissue ex vivo. *J Virol*; 77:8280-8289, 2003.

HAFFAJEE AD, SOCRANSKY SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000; 5:78-111, 1994.

HOLT SC, BRAMANTI TE. Factors in virulence expression and their role in periodontal disease pathogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*; 2:177-281, 1991.

IHIRA M, YOSHIKAWA T, OHASHI M, ENOMONO Y, AKIMOTO S, SUGA S, et al. Variation of Human Herpesvirus 7 Shedding in Saliva. *J Infect Dis*; 188:1352-1354, 2003.

IHIRA M, YOSHIKAWA T, SUZUKI K, et al. Correlation between human herpesvirus 6 and 7 infections after living related liver transplantation. *Microbio. Immunol*; 45(3):225-232, 2001.

IMBRONITO AV, OKUDA OS, FREITAS NM, LOTUFO FM, NUNES FD. Detection of Herpesviruses and periodontal pathogens in subgingival plaque of patients with chronic periodontitis, generalized aggressive periodontitis, or gingivitis. *J Periodontol*; 79 (2): 2313-2321, 2008.

JANJUA SA, KHACHEMOUNE A, Papillon-Lefèvre syndrome: Case report and review of the literature. *Dermatol Online J*; 10 (1): 13, 2004.

KAMMA JJ, SLOTS J. Herpesviral–bacterial interactions in aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*; 30: 1–6, 2003.

KRABBE KS, PERDERSEN M, BRUUNSGAARD H. Inflammatory mediators in the elderly. *Exp Geront*; 39(5):687-699, 2004.

KEMPF W, ADAMS V, MIRANDOLA P, MENOTTI L, DI LUCA D, MÜLLER B, et al. Persistence of Human Herpesvirus 7 in Normal Tissues Detected by Expression of a Structural Antigen, *J Infect Dis*; 178:841-845, 1998.

KONEMAN EW, ALLEN SD, JANDA WM, CHRECKENBERGER PL, WINN JR WC. Diagnóstico microbiológico. Editora médica e científica LTDA. Rio de Janeiro, 2001. Cap 21, p.1225-1226.

KRALL EA, DAWSON-HUGHES B, GARVEY AJ, GARCIA RI. Smoking, Smoking Cessation, and Tooth Loss. *J Dent Res*; 76(10): 1653-1659, 1997.

LAMONT RJ, CHAN A, BELTON CM, IZUTSU K, VASEL D, WEINBERG A. Porphyromonas gingivalis invasion of gingival epithelial cells. *Infect Immun*; 63:3878-3885, 1995.

LIMA PMA, SOUZA PEA, COSTA JE, GOMEZ RS, GOLLOB KJ, DUTRA WO. Aggressive and chronic periodontitis correlate with distinct cellular sources of key immunoregulatory cytokines. *J Periodontol*; 82: 86-94, 2011.

LINDHE, J. 1984, Tratado de Periodontologia Clínica, 1 Ed. Editora Guanabara S.A.

LINDHE J, KARRING T, LANG NP. 2005, Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral. 4a Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan.

LINHARES MI, EIZURU Y, TATENO S, MINAMISHIMA Y. Seroprevalence of human herpesvirus 6 infection in Brazilian and Japanese populations in the north-east of Brazil. *Microbiol Immunol*; 25:1023-1027, 1991.

LISTGARTEN MA. Pathogenesis of periodontitis. *J Clin Periodontol*; 13:418-430, 1986.

LIU R, BAL HS, DESTA T, KROTHAPALLI N, ALYASSI M, LUAN Q, GRAVES DT. Diabetes Enhances Periodontal Bone Loss through Enhanced Resorption and Diminished Bone Formation. *J Dent Res*; 85: 510, 2006.

LUPPI M, BAROZZI P, GARBER R, MAIORANA A, BONACORSI G, ARTUSI T, TROVATO R, et al. Expression of Human Herpesvirus-6 Antigens in Benign and Malignant Lymphoproliferative Disease, *S. Am J Pathol*; 153:815-823, 1998.

MADIGAN M, MARTINKO J, PARKER J, 2000. Brock – Biology of Microorganisms (9<sup>th</sup> edition). Prentice Hall; New Jersey, USA.

MAGGIO M, et al. Interleukin-6 in aging and chronic disease: a magnificent pathway. *J Gerontol Med Sci*; 61A(6):575-584, 2006.

MARTÍNEZ-MAESTRE MÁ, GONZÁLEZ-CEJUDO C, MACHUCA G, TORREJÓN R, CASTELO-BRANCO C. Periodontitis and osteoporosis: a systematic review. *Climacteric*; 13(6):523-529, 2010.

MATSUMOTO H, HATANAKA D, OGURA Y, CHIDA A, NAKAMURA Y, NONOYAMA S. Severe Human Herpesvirus 6-associated Encephalopathy in Three Children: Analysis of Cytokine Profiles and the Carnitine Palmitoyltransferase 2 Gene. *Pediat Infect Dis J*; 7: 224-228, 2011.

MENDEZ JC, DH DOCKRELL, MJ ESPY, et al. Human  $\beta$ -Herpesvirus interactions in solid organ transplant recipients. *J Infect Dis*; 183:179-184, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Projeto SB Brasil 2003: condições de saúde bucal da população brasileira 2002- 2003: resultados principais. Brasília: Ministério da Saúde; 2004.

MIRANDOLA P, SPONZILLI I, SOLENGHI E, MICHELONI C, RINALDI L, GOBBI G. Down-regulation of human leukocyte antigen class I and II and beta 2-microglobulin expression in human herpesvirus-7-infected cells. *J Infect Dis*; 1937:917-926, 2006.

MONTEBUGNOLI L, SERVIDIO D, PRATI C. Effectiveness of metronidazole gel on cyclosporine-induced gingival overgrowth in heart transplant patients. *Clin Oral Investig*; 6(1):24-7, 2002.

MOORE WEC, MOORE LVH. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol 2000*; 5:66-77, 1994.

NAHID MA, RIVERA M, LUCAS A, CHAN EK, KESAVALU L. Polymicrobial infection with periodontal pathogens specifically enhances microRNA miR-146a in ApoE-- mice during experimental periodontal disease. *Infect Immun*; 79(4):1597-1605, 2011.

NAKAJIMA T, UEKI-MARUYAMA K, ODA T, OHSAWA Y, ITO H, SEYMOUR GJ, YAMAZAKI K. Regulatory T-cells infiltrate periodontal disease tissues. *J Dent Res*; 84(7): 639-643, 2005.

NOVAK MJ. Necrotizing ulcerative periodontitis. *Ann Periodontol*. 1999; 4(1):74-8, 1999.

OLIVEIRA SA, TURNER DJ, KNOWLESW, NASCIMENTO JP, BROWN DW, WARD KN. Primary human herpesvirus-6 and 7 infections, often coinciding, misdiagnosed as measles in children from a tropical region of Brazil. *Epidemiol Infect*. 131:873-879, 2003.

PAGE RC, SCHROEDER H. 1982, *Periodontitis in Man and Other Animals. A Comparative Review*. Basel and New York: S. Karger.

PAGE RC, BECK JD. Risk assessment for periodontal diseases. *Int Dent J*; 47(2):61-87, 1997.

PEIGO MF, THOMASINI RL, PUGLIA ALP, COSTA SCB, BONON SHA, BOIN IFS. Human herpesvirus-7 in Brazilian liver transplant recipients: a follow-up comparison between molecular and immunological assays. *Transpl Infect Dis*; 11: 497-502, 2009.

PIERCE A, LINDSKOG S. The effect of an antibiotic/corticosteroid paste on inflammatory root resorption in vivo. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*; 64(2):216-20, 1987.

POZO F, TENORIO A. Detection and typing of lymphotropic herpesvirus by multiplex polymerase chain reaction. *J Virol Methods*. 79:9-19, 1999.

PRASAD S, MONACO EA JR, ANDREANA S, Gingival abscess removal using a soft-tissue laser. *Dent Today*; 30(2):114-116, 2011.

RESEARCH, SCIENCE AND THERAPY COMMITTEE. Position Paper: Diagnosis of Periodontal Diseases. Academy Report, *J Periodontol*; 74:1237-1247, 2003.

ROTOLO A, CASSAI E, FARINA R, CASELLI V, LAZZAROTTO T, TROMBELLI L. Human herpesvirus 7, Epstein-Barr virus and human cytomegalovirus in periodontal tissue of periodontally diseased and healthy subjects. *J Clin Periodontol*; 35: 831-837 2008.

SABETI M, DANESHMAND A, SIMON JH, SLOTS J. Cytomegalovirus-infected inflammatory cells in dental periapical lesions. *Oral Microbiol Immunol*; 24:434–436, 2009.

SABÓIA-DANTAS CJ, COUTRIN TLF, SAMPAIO-FILHO HR, SIQUEIRA JR JF. Herpesvirus in asymptomatic apical periodontitis lesions: an immunohistochemical approach. *Oral Microbiol Immunol*; 22: 320-325, 2007.

SALAHUDDIN SZ, KELLEY AS, KRUEGER GR, JOSEPHS SF, GUPTA S, ABLASHI DV. Human herpes virus-6 (HHV-6) in diseases. *Clin Diagn Virol*; 1(2):81-100, 1993.

SCHENKEIN HA, GUNSOLLEY JC, KOERTGE TE, SCHENKEIN JG, TEW JG. Assessment of the effects of smoking on the extent and severity of early-onset periodontitis. *J Am Dent Assoc*; 126:1107-1113, 1995.

SECHIERO P, CARRIGAN DR, ASANO Y, BENEDETTI L, CROWLEY RW, KOMAROFF AL, et al. Detection of Human Herpesvirus 6 in plasma of children with primary infection and immunosuppressed patients by Polymerase Chain Reaction. *J Infect Dis*; 171: 273-80, 1995.

SECCHIERO P, MIRANDOLA P, ZELLA D, CELEGHINI C, GONELLI A, VITALE M. Human herpesvirus 7 induces the functional up-regulation of tumor necrosis factor–related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) coupled to TRAIL-R1 down-modulation in CD41 T cells. *Blood*; 98:2474-2481, 2001.

SLOTS J. Herpesviral – bacterial synergy in the pathogenesis of human periodontitis. *Curr Opin Infect Dis*; 20: 278–283, 2007.

SLOTS J, KAMMA JJ, SUGAR C. The herpesvirus-*Porphyromonas gingivalis*-periodontitis axis, *J Periodontol Res*; 38:318-232, 2003.

SLOTS J. Oral viral infections of adults. *Periodontol 2000*; 49:60-86, 2009.

SLOTS J. Human viruses in periodontitis. *Periodontol 2000*; 53:89-110, 2010.

SUASSUNA JH, LEITE LL, VILLELA LH, Prevalence of cytomegalovirus infection in different patient groups of an urban university in Brazil. *Rev Soc Bras. Med Trop*; 28:105-108, 1995.

SUNDE PT, OLSEN I, ENERSEN M, BEISKE K, GRINDE B. Human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in apical and marginal periodontitis: a role in pathology? *J Med Virol*; 80: 1007-1011, 2008.

TAKAHASHI Y, YAMADA M, NAKAMURAJ, TSUZAKI T, PADILLA J, KITAMURA T, et al. Transmission of human herpesvirus 7 through multigenerational families in the same household. *Pediatr Infec Dis*. 16:975-978, 1997.

TANAKA K, KONDO T, MUKAI T, MIYOSHI H, YAMAMOTO Y, OKADA S, et al. Seroepidemiological study of human herpesvirus-6 and 7 in children of different ages and detection of these two viruses in throat swabs by polymerase chain reaction. *J Med Virol* 48:88-94, 1996.

TERÇAS AG, OLIVEIRA AEF, LOPES FF, MAIA FILHO EM. Radiographic study of the prevalence of apical periodontitis and endodontic treatment in the adult population of São Luís, MA, Brazil *J Appl Oral Sci*; 14(3): 115-118, 2006.

THOMASINI RL, SAMPAIO AM, BONON SHA, BOIN IFS, LEONARDI LS, LEONARDI M, COSTA SCB, Detection and Monitoring of Human Herpesvirus 7 in Adult Liver Transplant Patients: Impact on Clinical Course and Association With Cytomegalovirus. *Transp Proc*; 39, 1537–1539, 2007.

THOMASINI RT, MARTINS JM, PAROLA DC, BONON SHA, BOIN IFSF, LEONARDI LS, et al. Detection of human herpesvirus-7 by qualitative nested-PCR: comparison between healthy individuals and liver transplant recipients. *Rev Soc Bras Med Trop*; 41:556-559, 2008.

TORIGOE S, KUMAMOTO T, KOIDE W, TAYA K, YAMANISHI K. Clinical manifestation associated with human herpesvirus 7 infection. *Arch Dis Child*. 72:518-519, 1995.

- WAGNER E, HEWLETT M, 1999. Basic Virology. Blackwell Science, Inc.; USA.
- WARD KN, TURNER DJ, PARADA X, THIRUCHELVAN AD. Use of immunoglobulin G antibody avidity for differentiation of primary human herpesvirus 6 and 7 infections. J Clin Microbiol; 39:959-963, 2001.
- WATANABE SA, CORREIA-SILVA JF, HORTA MCR, COSTA JE, GOMEZ RS, EBV-1 and HCMV in aggressive periodontitis in Brazilian patients. Periodontol; 21(4): 336-341, 2007.
- WYATT LS, FRENKEL N. Human herpesvirus 7 is a constitutive inhabitant of adult human saliva. J Virol; 66: 3206-3209, 1992.
- WYATT LS, RODRIGUEZ WJ, BALACHADRAN N, FRENKEL N. Human herpesvirus 7: antigenic properties and prevalence in children and adults. J Virol; 66:3206-3209, 1992.
- WU Y, YAN J, CHEN L, *et al.* Infection frequency of Epstein-Barr virus in subgingival samples from patients with different periodontal status and its correlation with clinical parameters. J Zhejinang Univ; 7 (11):1862-1783, 2006.
- YAMALIK N, DELILBASI L, GÜLAY H, CAĞLAYAN F, HABERAL M, CAĞLAYAN G. The histological investigation of gingiva from patients with chronic renal failure, renal transplants, and periodontitis: a light and electron microscopic study. J Periodontol; 62(12):737-44, 1991.
- YAMAZAKI K, NAKAJIMA T, HARA K. Immunohistological analysis of T cell function subsets in chronic inflammatory periodontal disease. Clin Exp Immunol; 99: 384-391, 1995.
- YOSHIKAWA T, SUGA Y, ASANO Y, YAZAKI T, KODAMA H, OZAKI T. Distribution of antibodies to a causative agent of exanthem subitum (human herpesvirus-6) in healthy individuals. Pediatr; 84:675-677, 1989.
- ZAMBON JJ, HARASZTHY VI, HARIHARAN G, LALLY ET, DEMUTH DR. The microbiology of early-onset periodontitis: association of highly toxic Actinobacillus

actinomycetemcomitans strains with localized juvenile periodontitis. J Periodontol; 67:282-290, 1996.

ZINA LG, MOIMAZ SAS, SALIBA NA, GARBIN CAS. Periodontite materna e parto prematuro: aspectos biológicos, epidemiológicos e preventivos. Period; 15:10-5, 2005.

# Anexo I



## COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA E MÉRITO CIENTÍFICO

Fone: 1935431400

Parecer Nº 183/2009

### IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO

**Título:** Investigação da Influência do Citomegalovírus, do Epstein-Barr e dos Herpesvírus Humanos 6 e 7 no Curso da Periodontite Crônica em Pacientes Adultos

**Pesquisador Responsável:** Prof. Ms. Ronaldo Luís Thomasini

**Parecer:** O Comitê de Ética em Pesquisa e Mérito Científico Uniararas, após acatar os pareceres dos membros/relatores previamente designados para o presente caso e atendendo os dispositivos das resoluções 196/96, resolve aprovar, sem pendências o protocolo supracitado.

Em atendimento à Resolução 196/96, deverá ser encaminhado ao CEP para acompanhamento da pesquisa relatório final, até o dia , bem como a comunicação de qualquer intercorrência, efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V4).

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (item V.3) que requeiram ação imediata.

Decisão Homologada na reunião do dia 12/05/2009.

  
COORDENADOR DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA E  
MÉRITO CIENTÍFICO

FHO|Uniararas  
Av. Dr. Maximiliano Baruto, 500  
Jd. Universitário - Araras/SP  
CEP: 13607-339

[www.uniararas.br](http://www.uniararas.br)

## Anexo II

*J Periodont Res* 2011  
All rights reserved

# Correlation of cytomegalovirus and human herpesvirus 7 with CD3<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells in chronic periodontitis patients

Thomasini RL, Bonon SH, Durante P, Costa SCB. Correlation of cytomegalovirus and human herpesvirus 7 with CD3<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells in chronic periodontitis patients. *J Periodont Res* 2011; doi: 10.1111/j.1600-0765.2011.01413.x. © 2011 John Wiley & Sons A/S

**Background and Objective:** Human chronic periodontitis is an inflammatory process characterized by dense accumulation of immune cells in the periodontal tissue. The periodontitis can lead to loss of teeth in the patient and the pathogenesis of this disease is not completely known. This study tested the hypothesis that chronic periodontitis-affected sites can harbor beta-herpesviruses and that viruses are linked to a profile of the inflammatory infiltrate.

**Material and Methods:** Biopsies of periodontal tissue were taken from periodontitis-affected patients and from healthy subjects. Immunohistochemistry was performed to count CD19<sup>+</sup> B cells, CD3<sup>+</sup> total T cells, T-CD4<sup>+</sup> and T-CD8<sup>+</sup> cell subsets, and PCR was performed to detect cytomegalovirus and human herpesvirus 6 and 7 in the samples. One slide of each sample was stained with Giemsa for histopathological examination and to evaluate the quality of the cellular infiltrate.

**Results:** As expected, tissues collected from healthy subjects presented no significant level of inflammatory infiltration and were therefore excluded from immunostaining procedures. Results showed that CD19<sup>+</sup> B cells were in higher number than CD3<sup>+</sup> T cells in the periodontitis-affected tissue, but this was not statistically significant. The T-CD4<sup>+</sup> lymphocyte subset was significantly higher than the T-CD8<sup>+</sup> lymphocyte subset ( $p = 0.004$ ) in the samples. Cytomegalovirus and human herpesvirus 7 were found at periodontitis-affected sites, but not in tissue collected from healthy subjects ( $p = 0.04$  and  $p = 0.04$ , respectively). Human herpesvirus 6 was rarely detected. We found a correlation between cytomegalovirus and lower CD19<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> ratios (ratio < 0.9,  $p = 0.003$ ) and between human herpesvirus 7 and lower CD19<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> ratios (ratio < 0.9,  $p = 0.003$ ) and higher CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratios (ratio > 1.1,  $p = 0.002$ ).

**Conclusion:** This study shows that cytomegalovirus and human herpesvirus 7 can be present at periodontitis-affected sites but are uncommon at healthy periodontal sites. Moreover, our data suggest that cytomegalovirus can be related to an inflammatory infiltrate with predominance of CD3<sup>+</sup> T cells, whereas human herpesvirus 7 can be associated with an infiltrate with predominance of T-CD4<sup>+</sup> cells. However, further studies are necessary to support this hypothesis. Herpesviruses could play a role in human chronic periodontitis by modulation of the T cell response.

© 2011 John Wiley & Sons A/S

JOURNAL OF PERIODONTAL RESEARCH

doi:10.1111/j.1600-0765.2011.01413.x

R. L. Thomasini<sup>1,2</sup>, S. H. Bonon<sup>2</sup>,  
P. Durante<sup>2</sup>, S. C. B. Costa<sup>2</sup>

Department of Clinical Medicine, State University of Campinas, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil and <sup>2</sup>Laboratory of Clinical Pathology, Hemínio Ometto Foundation, UNIARARAS, Araras, São Paulo, Brazil

Professor Ronaldo L. Thomasini, MSc,  
Professor, Department of Clinical Medicine,  
Faculty of Medicine, State University of  
Campinas-UNICAMP, CEP 13081-970,  
Campinas, SP, Brazil  
Tel: +55 19 8136 6851  
Fax: +55 19 3544 9155  
e-mail: ronaldothomasini@yahoo.com.br

Key words: chronic periodontitis; cytomegalovirus; human herpesvirus 6; human herpesvirus 7

Accepted for publication July 27, 2011

Periodontitis is an inflammatory disease of the support tissues of the teeth that is clinically differentiated from gingivitis by the loss of the connective tissue attachment to the teeth, in the presence of concurrent gingival inflammation (1).

Although periodontitis is considered to be a process that involves a multifactorial interaction between microbial, host and environmental modulating factors (2), it is well accepted that periodontitis is associated with specific bacterial species and polymicrobial colonization of the teeth surfaces (3,4); however, the amount of bacterial plaque *per se* does not completely explain the clinical and pathological features of periodontitis (5–8).

Periodontal diseases are inflammatory processes characterized by dense accumulation of immune cells, including polymorphonuclear neutrophils, T and B lymphocytes, plasma cells, mast cells, monocytes and macrophages (9,10). The T cells have a very important role in the immune response, regulating the polyclonal activation of the B cells and plasma cells in the periodontitis-affected sites. The interaction between host immune system and periodontopathogens is relevant to the pathogenesis of periodontitis (11).

Some authors have also suggested that the presence of herpesviruses in the periodontal sites could play a role on the pathogenesis of human periodontitis (12–14). Herpesviruses are ubiquitous and after primary infection can persist latently in the host in several types of cells, including cells of the immune system. The cytomegalovirus (CMV) is the most-studied member of the betaherpesviruses in periodontal sites. Recently, the remaining two betaherpesviruses, known as human herpesvirus 6 (HHV-6) and human herpesvirus 7 (HHV-7), have been investigated because these viruses are frequently detected in saliva (12–15). Betaherpesviruses have also been studied after organ transplantation, and some authors have suggested that viruses can act directly or indirectly by modulating immune mechanisms and influencing the immune response due to viral replication in lymphocytes and monocytes/macrophages (16–19).

Inflammatory cells harboring herpesviruses present at sites of periodontal inflammation could contribute to the development and course of periodontitis (20–22). Cytomegalovirus can induce direct cytopathic effects on fibroblasts, keratinocytes, endothelial cells and inflammatory cells, including polymorphonuclear leukocytes, T lymphocytes and macrophages, and can also possibly affect bone cells. In periodontitis patients, T cells are activated and specific lymphocyte responses are driven by the nature of the initial antigenic stimuli. This process is supported by a complex cascade of events involving cytokines, chemokines and other inflammatory mediators, which could be altered due to CMV infection. Proinflammatory and anti-inflammatory balances controlled by different subsets of lymphocytes are thought to be crucial in the pathogenesis of periodontitis (23).

The expression of different cellular antigens can be dramatically altered in HHV-6-infected tissues, in which the viral infection can induce CD4 upregulation and CD3 downmodulation in the T cells. Human herpesvirus 6 can severely affect the physiology of secondary lymphoid organs through direct infection of T lymphocytes and modulation of key membrane receptors and chemokines (24). In addition, cytotoxicity and immunomodulatory effects caused by HHV-7 infection in T-CD4<sup>+</sup> lymphocytes *in vitro* and *in vivo* have been described as an adaptative mechanism to host immune system evasion (25).

Local immunomodulatory effects caused by herpesviral infection could facilitate bacterial proliferation and virulence or induce the release of cytokines and chemokines from inflammatory and connective tissue cells (22,26). In addition, viruses and bacteria could act in synergy to produce pathology.

As the CD19<sup>+</sup> B lymphocytes, CD3<sup>+</sup> T lymphocytes and the helper (T-CD4<sup>+</sup>) and cytotoxic (T-CD8<sup>+</sup>) subsets are involved in the pathogenesis of periodontitis and these cells can be infected by herpesviruses, studies to evaluate the association of herpesviruses with immune cell subpopulations

in the inflammatory infiltrate could contribute by clarifying the interaction between viruses and the immune system in the periodontal sites. However, few studies have reported any association of the presence of herpesviruses with profiles of inflammatory infiltrates (20,27).

The aim of this study was to determine the prevalence of CMV, HHV-6 and HHV-7 in biopsies obtained from periodontitis-affected patients and periodontally healthy subjects (control group). In addition, immunophenotyping to determinate CD19<sup>+</sup> B cells, CD3<sup>+</sup> total T cells and the T-CD4<sup>+</sup> and T-CD8<sup>+</sup> cell subsets was carried out to evaluate which profile of the inflammatory infiltrate was more frequently associated with the presence of CMV, HHV-6 and HHV-7.

## Material and methods

### Subjects

Twenty chronic periodontitis-affected patients were included in this study. Patients who presented with chronic periodontitis based on clinical and radiographic findings (28) were eligible to participate in this study. All patients were systemically healthy and had not received periodontal treatment or antibiotics for at least 6 mo prior to the clinical examination and sampling.

Each patient contributed one biopsy, collected from a clinically affected site involving epithelium and connective tissue facing the sulcus and periodontal pocket (13). In 12 healthy subjects (healthy controls), tissue samples were harvested from periodontally healthy sites. All healthy subjects presented probing depth  $\leq$  3 mm, with no attachment loss or gingival bleeding on probing; gingival biopsies were obtained from the sulcular region during tooth extraction procedures. The demographic data of the patients and healthy subjects included in this study are shown in Table 1.

The tissue fragments were rinsed several times with sterile saline and divided into two parts; one part was fixed in 10% buffered formalin and the other was stored frozen ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) in sterile flasks for DNA extraction.

Table 1. Demographic and clinical characteristics of the chronic periodontitis patients and control subjects included in this study

Patient group	Total (n)	Sex [male/ female; n (%)]	Age (years)		Average probing depth (mm)	Average clinical attachment loss (mm)
			Range	Median		
Chronic periodontitis	20	7/13 (35/75)	39-69	52	5.6	6.2
Control group	12	6/6 (50/50)	20-40	34	—	—

Formalin-fixed tissue fragments were destined for immunohistochemical analysis and histopathological examination. The DNA extraction was carried out using nonfixed tissue fragments on the same day as sampling. The protocol was designed in accordance with the requirements for research involving human subjects, was approved by the institutional Ethics Committee and complies with Declaration of Helsinki.

#### Extraction of DNA

Briefly, DNA was extracted from tissue fragments (finely minced) using a phenol-chloroform protocol after incubation overnight in lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0.2% dodecyl sodium sulfate and 100 µg proteinase K) at 56°C, followed by DNA precipitation with cold ethanol (13). The resulting DNA pellet was eluted in 50 µL of TE buffer (10 mM Tris and 1 mM EDTA) and stored frozen (-20°C) until PCR analysis.

#### PCR

Five microliters of DNA extracted following the protocol described in the previous subsection were used for the nested PCR using a mixture containing specific primers to CMV and employing a previously described technique (29,30). Primers and the protocol used for HHV-6 and HHV-7 nested PCR have also been described previously (31,32). The amplifications were performed using a Peltier Thermal Cycler (MJResearch, Waltham, MA, USA). Positive and negative controls for each virus were included systematically. Genome amplifications were carried out using the primers with DNA frag-

ments containing 159, 258 and 122 bp of CMV, HHV-6 and HHV-7, respectively. The nested PCR product was analyzed under ultraviolet light after electrophoresis in 2% agarose and stained with ethidium bromide. All nested PCRs were performed in duplicate using a second fresh aliquot. A PCR with primers for beta-globin gene amplification in the DNA extracted from samples was performed to detect possible false-negative results, which were not included in this study (33).

#### Tissue preparation and antigen retrieval

The formalin-fixed fragments of tissue were dehydrated following standard histochemical protocols and then paraffin embedded. The blocks containing tissue fragments were sectioned with a microtome (6 µm), and sections were then transferred to silane-pretreated slides (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). The slides were dewaxed by immersion in xylol, rehydrated and washed with phosphate-buffered saline (PBS). The antigen retrieval was carried out by immersion and incubation of the slides in citrate buffer (0.01 M sodium citrate, pH 6.0) at 96°C for 50 min in water-bath. The slides were washed in distilled water, PBS and immediately submitted to immunohistochemistry following the protocol described in the next subsection. A slide for each sample was also stained with Giemsa for histopathological examination.

#### Immunostaining procedure

The slide containing the tissue section was fixed with cold methanol-acetone (1:1) for 15 min and incubated with 1% bovine serum albumin in PBS for

15 min to avoid interference from nonspecific binding. The tissue section was covered with fluorescein isothiocyanate-conjugated mouse monoclonal antibodies (Biolegend, San Diego, CA, USA) against human CD19 (clone HIB19), CD3 (clone HIT3a), CD4 (clone RPA-T4) or CD8 (clone HIT8a) and incubated for 2 h at 37°C in the dark. The slides were washed three times with PBS and counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (300 nm in PBS) for 5 min in the dark. The slides were washed several times with PBS, mounted and immediately observed under an ultraviolet photomicroscope (Leica DM2000, Wetzlar, Germany). The intensity of light and filter was adjusted to provide perfect visualization and contrast of the cells among tissues. Cells that presented a specific light green fluorescence were considered to be positive. The nuclei of cells presented a light blue fluorescence after 4',6-diamidino-2-phenylindole staining.

#### Morphological and immunohistochemical analysis

Each sample was examined by light microscopy for determination of quality and intensity of infiltrate. The intensity of the infiltrate was graded according to the following scale: 0, absence of infiltration; 1, discrete infiltration; 2, moderate infiltration; and 3, intense infiltration.

The numbers of CD19<sup>+</sup> B cells, CD3<sup>+</sup> T cells and its T-CD4<sup>+</sup> and T-CD8<sup>+</sup> cell subsets were estimated by counting the total areas of the slide. The area of infiltration on the slide was focused under ultraviolet light at a magnification of ×400, and round positive cell (light green fluorescent cells) counts were performed. The total nuclei (stained light blue) counts were also performed in the same area of the slide. All counting procedures were performed in triplicate. The percentage of positive cells was calculated by dividing the number of positive cells by the total number of cells and multiplied by 100. The ratios of CD19<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> were calculated by dividing the number of CD19<sup>+</sup> cells by the number of CD3<sup>+</sup> cells, and the

number of CD4<sup>+</sup> cells by the number of CD8<sup>+</sup> cells, respectively.

#### Statistical analysis

The statistical analysis of continuous variables was performed using Student's paired *t*-test, and categorical variables were analyzed by the chi-square test or Fisher's exact test. A *p*-value of  $\leq 0.05$  was considered to be statistically significant.

## Results

### Morphological and immunohistochemical analysis

As expected, none of the 12 samples collected from healthy subjects presented any significant level of infiltration and therefore these samples were excluded from immunohistochemical procedures. Among the 20 samples collected from the chronic periodontitis-affected sites, all presented chronic inflammatory infiltrates with scores ranging from 1 to 3. In the chronic periodontitis-affected tissues, the percentages of scores 1, 2 and 3 were 21.4, 21.4 and 57.2%, respectively.

Evaluation of the distribution of each marker showed that CD19<sup>+</sup> B cells, CD3<sup>+</sup> total T cells and its T-CD4<sup>+</sup> and T-CD8<sup>+</sup> cell subsets were frequently found in the infiltrate of chronic periodontitis sites, although in different amounts and ratios. In most cases (60%), CD19<sup>+</sup> B cells were predominant in the sample (CD19/CD3 ratio > 1.1); however, the number of cells expressing CD19 was not significantly different from the number of cells expressing CD3 in the total number of the samples (Fig. 1A).

In nine of 20 (45%) patients, the T-CD4<sup>+</sup> cell subset were predominant in the sample (CD4/CD8 ratio > 1.1). No sample presented any predominance of T-CD8<sup>+</sup> cells. The number of cells expressing CD4 was significantly higher than the number of cells expressing CD8 ( $p = 0.004$ ) in the total number of samples (Fig. 1B).

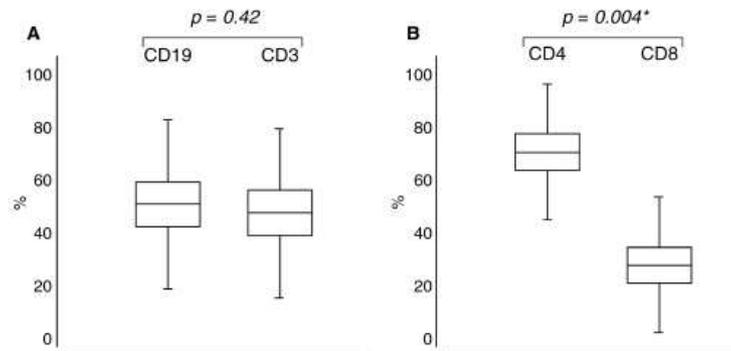


Fig. 1. (A) Relative frequencies of CD19<sup>+</sup> cells (B cells) and CD3<sup>+</sup> cells (T cells) in the overall samples obtained from chronic periodontitis patients. No significant difference was found between these subpopulations. (B) Relative frequencies of T-CD4<sup>+</sup> and T-CD8<sup>+</sup> subsets. Significant predominance of T-CD4<sup>+</sup> cells over T-CD8<sup>+</sup> cells in the samples (paired *t*-test). Whiskers indicate the standard deviation.

Table 2. Distribution of cytomegalovirus (CMV), human herpesvirus 6 (HHV-6) and human herpesvirus 7 (HHV-7) as detected by nested PCR in biopsies collected from periodontitis-affected sites and healthy subjects

	Affected sites [n (%)]	Healthy control [n (%)]	<i>p</i> -Value
CMV	6 of 20 (30)	0 of 12 (0)	0.04*
HHV-6	0 of 20 (0)	1 of 12 (5)	NS
HHV-7	6 of 20 (30)	0 of 12 (0)	0.04*

\* Fischer's exact test. NS, not significant.

### Nested PCR analysis for CMV, HHV-6 and HHV-7

Six samples collected from chronic periodontitis-affected sites (30%) presented positive nested PCR for CMV DNA detection. Cytomegalovirus nested PCR was negative in healthy subjects. Human herpesvirus-6 was not detected in any chronic periodontitis patients, while one sample collected from a healthy subject was positive for HHV-6. In chronic periodontitis-affected sites, HHV-7 was detected in six of 20 (30%) sites and was not detected in samples collected from healthy subjects. Cytomegalovirus and HHV-7 were significantly more frequent in chronic periodontitis-affected sites than in other sites ( $p = 0.04$  and  $p = 0.04$ , respectively). Table 2 shows the frequency for each herpesvirus in each type of subject. Cytomegalovirus and HHV-7 were not correlated with the severity of cases nor with probing depth.

### Cytomegalovirus, HHV-7 and immunophenotypic features of the infiltrate

Cytomegalovirus was most frequently found in samples when CD3<sup>+</sup> T cells were predominant in the sample (CD19/CD3 ratio < 0.9,  $p = 0.003$ ). No correlation was found between CMV and T-CD4<sup>+</sup> and/or T-CD8<sup>+</sup> cell subsets.

Human herpesvirus-7 was also most frequently found when CD3<sup>+</sup> T cells were predominant in the sample (CD19/CD3 ratio < 0.9,  $p = 0.003$ ). Moreover, HHV-7 was associated with predominance of T-CD4<sup>+</sup> in the samples (CD4/CD8 ratio > 1.1,  $p = 0.002$ ). Table 3 shows the frequency of detection of each virus in different profiles of CD19/CD3 and CD4/CD8 ratios found in the total number of samples studied.

## Discussion

In the present study, tissues biopsied from periodontitis-affected patients

Table 3. Frequencies of each virus as detected by nested PCR and distributed by each profile of CD marker (ratios) on the samples analyzed

CD marker	CMV positive			HHV-7 positive		
	n	(%)	p-Value	n	(%)	p-Value
CD19/CD3 ratio						
0.9-1.1	4 of 20	(20)	0.34	2 of 4	50	0.34
>1.1	12 of 20	(60)	NS	0 of 12	0	NS
<0.9	4 of 20	(20)	0.003*	4 of 4	100	0.003*
CD4/CD8 ratio						
0.9-1.1	11 of 20	(55)	0.15	0 of 11	0	NS
>1.1	9 of 20	(45)	0.66	6 of 9	100	0.002*
<0.9	0 of 20	(0)	—	—	—	—

\* Fischer's exact test. NS, not significant.

and from healthy subjects were analyzed to determinate the profile of the inflammatory infiltrate and the possible association between the profile and the presence of CMV, HHV-6 and HHV-7 in the samples.

The results found in this study demonstrated a discrete predominance of CD19<sup>+</sup> B cells in chronic periodontitis-affected sites, although CD3<sup>+</sup> T cells were also frequently found. The T-CD4<sup>+</sup> cell subset was significantly predominant compared with the T-CD8<sup>+</sup> cell subset. Nakajima *et al.* (34) found a dominance of CD19<sup>+</sup> B cells over CD3<sup>+</sup> T cells and a similar dominance of the T-CD4<sup>+</sup> subset in samples collected from chronic periodontitis patients. Yamazaki *et al.* (11) also found a dominance of CD19<sup>+</sup> B cells, although CD3<sup>+</sup> T cells were found in significant numbers and, similar to the present study, T-CD4<sup>+</sup> cells were present in higher numbers than T-CD8<sup>+</sup> cells. In contrast, Cardoso *et al.* (10) found a predominance of CD3<sup>+</sup> T cells and no significant difference between T-CD4<sup>+</sup> and T-CD8<sup>+</sup> cell subsets; however, several lymphocyte subpopulations were present in the majority of cases, although the ratio of CD19<sup>+</sup> B cells, total CD3<sup>+</sup> T cells and T cell subsets may be variable.

Several studies have demonstrated a significant role of T and B lymphocytes in the progression of chronic periodontitis. Conversion of a stable T cell lesion to a progressive B cell lesion has been hypothesized as being associated with the physiopathology of chronic periodontitis. Also, the conversion of

gingivitis to periodontitis involving different phenotypes of T cell infiltration has been studied (11).

The present study revealed that B cells and T cells, especially the T-CD4<sup>+</sup> cell subset, were an important component of the chronic inflammatory infiltration in chronic periodontitis patients. Data reported by Lima *et al.* (35), regarding T-CD4<sup>+</sup> cells in chronic and aggressive periodontitis, showed that T-CD4<sup>+</sup> cells from chronic periodontitis patients are more committed to interleukin-4 production and the T-CD4<sup>+</sup> cells from aggressive periodontitis patients are more committed to tumor necrosis factor- $\alpha$  production. This signifies that the cytokine pattern may be different between different clinical forms of the disease. T cells can be a common reservoir of betaherpesviruses, and the present study reports that T cells are present in significant numbers in the infiltrate of chronic periodontitis sites and that cells may be harboring herpesviruses.

In the present study, CMV and HHV-7 were significantly more frequent in periodontitis-affected sites than in samples from healthy subject; however, HHV-6 was not frequently found in the periodontal tissue. Some authors have reported the presence of CMV DNA in periodontitis-affected patients. In a Brazilian population, Casarin *et al.* (36) found 37-39.1% positivity for CMV in type 2 diabetic patients, and Imbronito *et al.* (37) described 50% positivity in nondiabetic subjects. Chalabi *et al.* (38) described the presence of viral CMV DNA in 59% of patients, but only

when probing depth was  $\geq 6$  mm. In the present study, we did not find any correlation between probing depth and the presence of CMV. Bilichodmath *et al.* (2) found a 26.3% level of CMV DNA in chronic periodontitis-affected sites. Grenier *et al.* (4) and Watanabe *et al.* (39) found lower frequencies of 11 and 6% of CMV DNA, respectively.

Few studies in the literature have reported the presence of HHV-6 and HHV-7 DNA in periodontitis-affected patients. Cassai *et al.* (13) did not find HHV-6 DNA in affected sites, and found HHV-6 DNA in 10% of tissue biopsied from healthy subjects, demonstrating reasonably similar results to this study. Contreras *et al.* (12) described 21% positivity for HHV-6 DNA in affected sites, with no detection in nonaffected sites by nested PCR. Contreras *et al.* (15) detected HHV-6 DNA in 21% of periodontitis-affected patients, but did not include nonaffected control samples or periodontally healthy subjects. In the present study, only one sample collected from a healthy subject was positive for HHV-6 DNA. It is important to mention that our protocols were combined with a PCR protocol for beta-globin gene amplification as an internal quality control for DNA extraction and the presence of inhibitors (31,33).

In the present study, HHV-7 DNA was detected in 30% of the periodontitis-affected sites and was not detected in healthy subjects. Contreras *et al.* (12) reported 43% positivity for HHV-7 by PCR in periodontitis patients and did not detect HHV-7 DNA in periodontally healthy subjects. Another study from the same authors (15) reported that 29% of periodontitis patients were positive for HHV-7, which is similar to the present study. In contrast, Cassai *et al.* (13) found a high prevalence of HHV-7 DNA in both periodontitis-affected and healthy subjects (77 and 70%, respectively).

Naturally, to compare studies many types of different factors must be considered, such as the type and number of samples, sensitivity of primers used for PCR, presence of systemic disease, immunosenescence, ethnic origin and whether the patient presents with

aggressive or chronic periodontitis. In addition, apical and marginal periodontitis should be considered separately from each other. However, with regard to the differences between studies, our present data confirm those reported in other studies.

Although the presence of betaherpesviruses related to the profile of the inflammatory infiltrate in periodontitis-affected sites has been documented (20,27), there are few reports in the literature concerning this association until the present study.

Association of the herpesviruses with the immune cell subpopulation could help our understanding of the involvement of these viruses with human periodontitis. Contreras *et al.* (20) found that, in 20% of biopsies obtained from periodontitis-affected sites, CD3<sup>+</sup> T cells harbored CMV, and CD3<sup>+</sup> T cells from healthy gingiva did not contain this virus. Sabeti *et al.* (27) also found CMV in CD3<sup>+</sup> T cells of 54% of periapical lesions. Although, hypothetically, T-CD4<sup>+</sup> cells are the main target for HHV-7 infection in the chronic periodontitis inflammatory infiltrate, there is a lack of data available to support this hypothesis.

Herein, we have focused on the presence of betaherpesviruses in association with the phenotype and number of each lymphocyte subpopulation in the inflammatory infiltrate. In the present study, CMV correlated with samples that presented a predominance of CD3<sup>+</sup> T cells, while HHV-7 correlated with samples in which the T-CD4<sup>+</sup> cell subset was predominant. Although associations were observed between CMV and CD3<sup>+</sup> T cells and between HHV-7 with the T-CD4<sup>+</sup> predominance in the samples, the viruses could act as cofactors, modulating the activity of these cells. The release of different types of cytokines and B lymphocyte activation orchestrated by T lymphocytes has been shown to be an important feature in the chronic periodontitis process (10,11). In addition, T-reg cells (T regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) may be involved in modulation of the local immune response in chronic periodontitis patients (10). Cells infected

by viruses suffer complex changes, leading to the up- or downregulation of different factors that could contribute to the pathogenesis of the inflammatory process.

Cytomegalovirus has the potential to suppress the function of antigen-specific T cytotoxic cells and can cause a reduction in the number of T-CD8<sup>+</sup> cells, leading to decreased cell-mediated immune function. Immunossuppressive effects that involve direct impairment of lymphocytes, inducing the production of auto-antibodies and inflammatory mediators, have been described (20). In the present study, we failed to find a correlation between specific T lymphocyte subsets with CMV, possibly due to the fact that this virus can infect types of cells such as monocytes/macrophages, dendritic cells, epithelial cells, fibroblasts and endothelial cells (9) which may be present in the periodontal tissue.

Human herpesvirus 7 infects most specifically the T-CD4<sup>+</sup> cells, which can result in cytotoxicity and immunomodulatory activities in the host (25). It has also been demonstrated that the downmodulation of human leukocyte antigen (HLA) and  $\beta$ 2-microglobulin expression by HHV-7 is linked to viral replication and is not merely the consequence of the interaction of virions with the cell surface. Infected cells can therefore escape efficiently from host immune pressure, which might explain the persistence of HHV-7-positive cells in several types of tumors and chronic infectious diseases (40).

Although HHV-7 has restricted tropism to CD4<sup>+</sup> cells, it should be noted that HHV-7-infected T-CD4<sup>+</sup> cells kill uninfected T-CD8<sup>+</sup> cells *in vitro*. Moreover, HLA class I and  $\beta$ 2-microglobulin are also downmodulated in the T-CD8<sup>+</sup> cells in the presence of HHV-7-infected leukocytes *in vitro* (25). In the present study, we found lower numbers of T-CD8<sup>+</sup> cells compared with T-CD4<sup>+</sup> cells in the samples, and this could be the result of CMV and/or HHV-7 infections in the host cells.

A 'herpesvirus-bacterial pathogen' model has been proposed, in which the herpesviral infection could facilitate bacterial proliferation and virulence or

induce the release of cytokines and chemokines from inflammatory and connective cells (6,22).

Cytopathogenic effects, immune evasion, immunopathogenicity, latency, reactivation and cell tropism are important aspects related to herpesviruses, with regard to periodontitis. Herpesviral infection causes a release of proinflammatory cytokines, which can activate T lymphocytes and osteoclasts (41). As the CD3<sup>+</sup> T cells and T-CD4<sup>+</sup> lymphocyte subpopulation could harbor CMV and/or HHV-7, these viruses could play a role in the pathogenesis of chronic periodontitis. Immunohistochemical methods or flow cytometry could be performed to help to confirm herpesviral infections and co-localization of viral antigens and CD markers. These methods are under investigation in our center.

In conclusion, this study shows that CMV and HHV-7 can be present at periodontitis-affected sites but are uncommon at healthy periodontal sites. Moreover, our data suggest that CMV can be related to an inflammatory infiltrate with predominance of CD3<sup>+</sup> T cells, while HHV-7 can be associated with an infiltrate with predominance of T-CD4<sup>+</sup> cells; however, further studies are necessary to support this hypothesis. Herpesviruses could play a role in human chronic periodontitis by modulation of the T cell response.

## Acknowledgements

We thank the State University of Campinas for the use of the laboratory facilities, and Ms Renata Barbieri and Dr Grasiela D. C. S. Aguiar of the laboratory of Micromorphology of Herminio Ometto Foundation, UNIARARAS, and Dr Ana Veiga from State University of Campinas, UNICAMP, for technical assistance. We also thank Dr Norma G. S. Mota for a very useful discussion.

## References

1. American Academy of Periodontology. The pathogenesis of periodontal diseases. *J Periodontol* 1999;70:457-470.

2. Bilichodmath S, Mangalekar SB, Sharma DCG, Prabhakar AK, Reddy SB, Kalburgi NB. Herpesvirus in chronic and aggressive periodontitis patients in an Indian population. *J Oral Sci* 2009;**51**:79–86.
3. Sunde PT, Olsen I, Enersen M, Beiske K, Grinde B. Human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in apical and marginal periodontitis: a role in pathology? *J Med Virol* 2008;**80**:1007–1011.
4. 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;**24**:506–509.
5. Saygun I, Sashin S, Ozdemir A, Kurtis B, Yapar M, Kubar M. Detection of human herpesvirus in patients with chronic periodontitis and the relationship between viruses and clinical parameters. *J Periodontol* 2002;**73**:1437–1443.
6. Slots J, Kamma JJ, Sugar C. The herpesvirus-*Porphyromonas gingivalis*-periodontitis axis. *J Periodontol Res* 2003;**38**:318–323.
7. Yapar M, Saygun I, Ozdemir A, Kubar A, Sahin S. Prevalence of human herpesviruses in patients with aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2003;**74**:1634–1640.
8. Kubar A, Saygun I, Ozdemir A, Yapar M, Slots J. Real-time PCR quantification of HCMV and EBV in periodontal pockets and adjacent gingival of periodontitis lesions. *J Periodontol Res* 2005;**40**:97–104.
9. Sabóia-Dantas CJ, Couturin TLF, Sampaio-Filho HR, Siqueira JF Jr. Herpesvirus in asymptomatic apical periodontitis lesions: an immunohistochemical approach. *Oral Microbiol Immunol* 2007;**22**:320–325.
10. Cardoso CR, Garlet GP, Moreira AP, Martins Júnior W, Rossi MA, Silva JS. Characterization of CD4+ CD25+ natural regulatory T cells in the inflammatory infiltrate of human chronic periodontitis. *J Leukoc Biol* 2008;**84**:311–318.
11. Yamazaki K, Nakajima T, Hara K. Immunohistological analysis of T cell function subsets in chronic inflammatory periodontal disease. *Clin Exp Immunol* 1995;**99**:384–391.
12. Contreras A, Nowzari H, Slots J. Herpesvirus in periodontal pocket and gingival tissue specimens. *Oral Microbiol Immunol* 2000;**15**:15–18.
13. Cassai E, Galvan M, Trombelli L, Rotola A. HHV-6, HHV-7, HHV-8 in gingival biopsies from chronic adult periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 2003;**30**:184–191.
14. Rotola A, Cassai E, Farina R, Caselli V, Lazzarotto T, Trombelli L. Human herpesvirus 7, Epstein-Barr virus and human cytomegalovirus in periodontal tissue of periodontally diseased and healthy subjects. *J Clin Periodontol* 2008;**35**:831–837.
15. Contreras A, Madirossian A, Slots J. Herpesviruses in HIV-periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001;**28**:96–102.
16. Ihira M, Yoshikawa T, Suzuki K. Correlation between human herpesvirus 6 and 7 infections after living related liver transplantation. *Microbiol Immunol* 2001;**45**:225–232.
17. Mendez JC, Dockrell DH, Espy MJ. Human  $\beta$ -herpesvirus interactions in solid organ transplant recipients. *J Infect Dis* 2001;**183**:179–184.
18. Feldstein AE, Razonable RR, Boyce TG. Prevalence and clinical significance of human herpesvirus 6 and 7 active infection in pediatric liver transplant patients. *Pediatr Transplant* 2003;**7**:125–129.
19. Peigo MF, Thomasini RL, Puglia ALP, Costa SCB, Bonon SHA, Boin IFS. Human herpesvirus-7 in Brazilian liver transplant recipients: a follow-up comparison between molecular and immunological assays. *Transpl Infect Dis* 2009;**11**:497–502.
20. Contreras A, Umeda M, Chen C, Bakker I, Morrison JL, Slots J. Relationship between herpesvirus and adult periodontitis and periodontopathic bacteria. *J Periodontol* 1999;**70**:478–484.
21. Kamma JJ, Slots J. Herpesviral-bacterial interactions in aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2003;**30**:1–6.
22. Slots J. Herpesviral – bacterial synergy in the pathogenesis of human periodontitis. *Curr Opin Infect Dis* 2007;**20**:278–283.
23. Slots J. Human viruses in periodontitis. *Periodontol* 2000;**20**:53–89–110.
24. Grivel JC, Santoro F, Chen S *et al*. Pathogenic effects of human herpesvirus 6 in human lymphoid tissue *ex vivo*. *J Virol* 2003;**77**:8280–8289.
25. Secchiero P, Mirandola P, Zella D *et al*. Human herpesvirus 7 induces the functional up-regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) coupled to TRAIL-R1 down-modulation in CD41 T cells. *Blood* 2001;**98**:2474–2481.
26. Slots J, Contreras A. Herpesvirus: a unifying causative factor in periodontitis? *Oral Microbiol Immunol* 2000;**15**:277–280.
27. Sabeti M, Daneshmand A, Simon JH, Slots J. Cytomegalovirus-infected inflammatory cells in dental periapical lesions. *Oral Microbiol Immunol* 2009;**24**:434–436.
28. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999;**4**:1–6.
29. Demmler GJ, Buffone CJ, Schimbor CM, May R. Detection of cytomegalovirus in urine newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification. *J Infect Dis* 1988;**158**:1177–1184.
30. Shibata D, Martin WJ, Appleman DM, Causey JM, Leedom N. Detection of cytomegalovirus DNA in peripheral blood of patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1988;**158**:1185–1192.
31. Secchiero P, Carrigan DR, Asano Y, Benedetti L, Crowley RW, Komaroff AL. Detection of human herpes virus 6 in plasma of children with primary infection and immunosuppressed patients by polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1995;**171**:273–280.
32. Pozo F, Tenorio A. Detection and typing of lymphotropic herpesvirus by multiplex polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1999;**79**:9–19.
33. Aquino VH, Figueiredo LTM. Cytomegalovirus infection in renal transplant recipients diagnosed by Nested-PCR. *Braz J Med Biol Res* 2001;**34**:93–101.
34. Nakajima T, Ueki-Maruyama K, Oda T *et al*. Regulatory T-cells infiltrate periodontal disease tissues. *J Dent Res* 2005;**84**:639–643.
35. Lima PMA, Souza PEA, Costa JE, Gomez RS, Gollob KJ, Dutra WO. Aggressive and chronic periodontitis correlate with distinct cellular sources of key immunoregulatory cytokines. *J Periodontol* 2011;**82**:86–94.
36. Casarin RCV, Duarte PM, Santos VR *et al*. Influence of glycemic control and Epstein-Bar and Cytomegalovirus infection in periodontal pocket of type 2 diabetic subjects. *Arch Oral Biol* 2010;**55**:902–906.
37. Imbroni AV, Okuda OS, Freitas NM, Lotufo FM, Nunes FD. Detection of herpesviruses and periodontal pathogens in subgingival plaque of patients with chronic periodontitis, generalized aggressive periodontitis, or gingivitis. *J Periodontol* 2008;**79**:2313–2321.
38. Chalabi M, Moghin S, Mogharehabet A, Najafi F, Rezaie F. EBV and CMV chronic periodontitis: a prevalence study. *Arch Virol* 2008;**153**:1917–1919.
39. Watanabe SA, Correia-Silva JF, Horta MCR, Costa JE, Gomez RS. EBV-1 and HCMV in aggressive periodontitis in Brazilian patients. *Braz Oral Res* 2007;**21**:336–341.
40. Mirandola P, Sponzilli I, Solenghi E *et al*. Down-regulation of human leukocyte antigen class I and II and beta 2-microglobulin expression in human herpesvirus-7-infected cells. *J Infect Dis* 2006;**193**:917–926.
41. Slots J. Oral viral infections of adults. *Periodontol* 2000;**20**:99:60–86.