

UNIVERSIDADE SANTO AMARO

Mestrado em Odontologia

Marco Aurélio Mena

**DETECÇÃO DE VÍRUS EPSTEIN-BARR EM PACIENTES COM
DOENÇA RENAL CRÔNICA APÓS TRATAMENTO PERIODONTAL
NÃO-CIRÚRGICO**

São Paulo

2021

M488d Mena, Marco Aurélio.

Detecção de vírus Epstein-Barr em pacientes com doença renal crônica após tratamento periodontal não-cirúrgico / Marco Aurélio Mena. – São Paulo, 2021.

38 f.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) — Universidade Santo Amaro, 2021.

Orientador: Profa. Dra. Yeon Jung Kim.

1. Vírus Epstein-Barr. 2. Doença periodontal. 3. Doença renal crônica. I. Mena, Marco Aurélio, orient. II. Universidade Santo Amaro. III. Título.

Elaborada por Janice Toledo dos Santos – CRB 8 / 8391

Marco Aurélio Mena

**DETECÇÃO DE VÍRUS EPSTEIN-BARR EM PACIENTES COM
DOENÇA RENAL CRÔNICA APÓS TRATAMENTO PERIODONTAL
NÃO-CIRÚRGICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.
Orientadora: Prof^a. Dra. Yeon Jung Kim

São Paulo

2021

Marco Aurélio Mena

**DETECÇÃO DE VÍRUS EPSTEIN-BARR EM PACIENTES COM
DOENÇA RENAL CRÔNICA APÓS TRATAMENTO PERIODONTAL
NÃO-CIRÚRGICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Yeon Jung Kim

São Paulo, 29 de novembro de 2021.

Banca examinadora

Prof(a) Dr(a) Yeon Jung Kim

Prof(a) Dr(a) Debora Pallos

Prof(a) Dr(a) Paulo Henrique Braz Silva

Conceito final

Dedico este trabalho a Deus, minha esposa Gláucia Cristina Pelegrini Mena, meu filho Marco Aurélio Mena Filho, meus pais João Mena e Maria Aparecida Luqueis Mena e todos que direta ou indiretamente fizeram parte da realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a Deus, o responsável pelas minhas vitórias, e a todas as pessoas que dedicaram um pouco do seu tempo para me auxiliarem na elaboração e conclusão deste trabalho.

A minha esposa Gláucia Cristina Pelegrini Mena, meu filho Marco Aurélio Mena Filho e familiares pelo apoio, companheirismo e compreensão nesta jornada.

Aos meus colegas universitários que muito me apoiaram no decorrer da jornada acadêmica, que Deus lhes retribua cobrindo-os com sua poderosa mão.

Aos queridos professores do mestrado que se desdobraram em atenção, amor, companheirismo e dedicação, muitas vezes renunciando do tempo com suas famílias para dividirem seus preciosos conhecimentos, que Deus os abençoe derramando sabedoria sobre todos.

Aos professores Debora Pallos, Paulo Henrique Braz Silva e Rodrigo Melim Zerbinati pela participação direta neste projeto.

A minha professora orientadora Yeon Jung Kim, por seu tempo dedicado à instrução e pela parceria no desenvolvimento do projeto e na conclusão da dissertação.

Por fim, meus sinceros agradecimentos a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da realização deste trabalho.

*Mesmo que demore e precise que você dê tudo de si, alguns sonhos merecem
serem perseguidos até o fim. Não desista!*

Lista de Figuras

Figura 1 - Desenho do estudo	28
------------------------------------	----

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Descrição das sequências dos primers e sondas utilizadas no PCR em tempo real para detecção do EBV e TTV
Tabela 2 - Dados coletados referentes a presença do EBV ou não na saliva e sua quantificação em cp/ml
Tabela 3 - Parâmetros periodontais avaliados nos tempos T0 e T1

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Esquema gráfico de dados coletados referentes a presença ou não do EBV na saliva

Lista de Abreviaturas

<i>Aa</i>	<i>Aggregatibacteractinomycetemcomitans</i>
<i>C</i>	<i>Campylobacter</i>
CMV	Citomegalovírus
DM	Diabetes mellitus
DRC	Doença renal crônica
DP	Doença periodontal
EBV	Vírus Epstein-Barr
EBV-1	Vírus Epstein-Barr 1
EBV-2	Vírus Epstein-Barr 2
ELFA	Ensaio imunofluorescente ligado a enzima
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FCG	Fluído crevicular gengival
<i>Fn</i>	<i>Fusobacteriumnucleatum</i>
GG	Gengivitegeneralizada
GSSG	Glutaciona oxidada
HBV	Vírus hepatite B
HCV	Vírus hepatite C
HD	Hemodiálise
HHV	Família do herpesvírus
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HSV	Vírus Herpes simplex
HSV-1	Vírus Herpes simplex tipo 1
HSV-2	Vírus Herpes simplex tipo 2
HHV-3	Herpesvírus humano tipo 3
HHV-4	Herpesvírus humano 4
HHV-5	Herpesvírus humano 5
HHV-6	Herpesvírus humano tipo 6
HHV-7	Herpesvírus humano tipo 7
HHV-8	Herpesvírus humano tipo 8
IG	Índice gengival
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M

IHO	Instrução de higiene oral
IP	Índice de placa
IS	Indivíduo saudável
JEC	Junção esmalte-cimento
LPO	Líquen plano oral
mRNA	RNA mensageiro
MG	Margem gengival
NCI	Nível clínico de inserção
OPG	Osteoprotegerina
PA	Periodontite agressiva
PC	Periodontite crônica
PCR	Reação em cadeia da polimerase
<i>Pg</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>Pi</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
PI	Perda de inserção
<i>Pn</i>	<i>Prevotellanigrescens</i>
PPA	Periodontite periapical assintomática
PPS	Periodontite periapical sintomática
PS	Profundidade de sondagem
PTLD	Doença linfoproliferativa pós-transplante
PUFA	Ácidos graxos poliinsaturados n-3
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B
RAR	Raspagem e alisamento radicular
SS	Síndrome de Sjogren
<i>Td</i>	<i>Treponema denticola</i>
<i>Tf</i>	<i>Tannerella forsythia</i>
TG	Tecido de granulação
TFG	Taxa de filtração glomerular
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VCA	Capsídeo viral EBV
VZV	Vírus Varicela-zóster

Lista de Símbolos

α	Alfa
xg	Força centrífuga aplicada
°C	Grau celsius
=	Igual
+	Mais
\pm	Mais ou menos
®	Marca registrada
>	Maior que
<	Menor que
\geq	Maior ou igual
\leq	Menor ou igual
μ l	Microlitro
mg	Miligrama
ml	Mililitros
mm	Milimitros
nM	Nanômetro
n	Número
%	Porcentagem
'	Segundos
™	Trade Mark
v	Versão
vs	Versus
x	Vezes

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO
2. REVISÃO DE LITERATURA
3. OBJETIVOS	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS
4.1. Coleta de Saliva
4.2. Extração de DNA
4.3. Identificação e quantificação de EBV por PCR em tempo real
5. RESULTADOS
6. DISCUSSÃO
7. CONCLUSÃO
REFERÊNCIAS

RESUMO

Pacientes com doença renal crônica (DRC) apresentam alterações imunológicas importantes pois os rins param de funcionar gradualmente, elevando os níveis de uréia e substâncias tóxicas no sangue que favorecem a ocorrência de infecções. Uma infecção ativa pelo vírus Epstein-Barr (EBV) pode prejudicar a primeira linha de defesa periodontal dos neutrófilos e evitar a resposta linfocítica T, vital para eliminar e conter bactérias causadoras de periodontite. Dessa forma, os vírus da família herpesvírus (HHV), presentes na cavidade oral de pacientes com DRC podem contribuir para a ocorrência de doenças periodontais (DP). O objetivo deste estudo foi investigar o efeito do tratamento periodontal não-cirúrgico na detecção e quantificação da carga viral de EBV em saliva de indivíduos brasileiros com DRC em hemodiálise (HD). Um total de 19 pacientes (sendo 3 do gênero feminino e 16 do gênero masculino com idades médias de $46,15 \pm 10,6$ anos) foram incluídos no estudo. Inicialmente foram avaliados parâmetros periodontais como índice de placa (IP), índice gengival (IG), perda de inserção clínica (PI), profundidade de bolsa periodontal (PS). As amostras de saliva foram coletadas em T0 (baseline) e T1 (30 dias) após tratamento periodontal não-cirúrgico e analisadas por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). Nos resultados, em T0 (32%) dos pacientes tiveram o vírus EBV presente na saliva com uma média quantitativa 84516,3 cp/ml. Para o período T1 (42%) dos indivíduos incluídos na pesquisa foram detectados com o EBV presente na saliva com uma média quantitativa de 91536,90 cp/ml. Nesse período, influências positivas e significativas para os parâmetros periodontais em IG e IP ($p < 0,0001$) foram detectados. Na conclusão do presente estudo, o tratamento periodontal não-cirúrgico melhorou o estado clínico de inflamação periodontal de pacientes com DRC em hemodiálise com periodontite crônica (PC), entretanto, não influenciou na carga viral de EBV presente na saliva desta população.

Palavras-chave: Epstein-Barr Vírus. Doença Periodontal. Doença Renal Crônica.

ABSTRACT

Patients with chronic kidney disease (CKD) have important immunological alterations because the kidneys gradually stop working, raising the levels of urea and toxic substances in the blood that favor the occurrence of infections. An active infection with the Epstein-Barr virus (EBV) can impair the neutrophils' first line of periodontal defense and prevent the T lymphocytic response, vital for eliminating and containing bacteria that cause periodontitis. Thus, viruses of the herpesvirus (HHV) family, present in the oral cavity of patients with CKD, can contribute to the occurrence of periodontal diseases (PD). The object of this study was to investigate the effect of non-surgical periodontal treatment on the detection and quantification of EBV viral load in saliva of Brazilian individuals with CKD undergoing hemodialysis (HD). A total of 19 patients (3 females and 16 males with a average age of $46,15 \pm 10,6$ years) were included in the study. Initially, periodontal parameters such as plaque index (PI), gingival index (GI), clinical attachment loss (PI), periodontal pocket depth (PS) were evaluated. Saliva samples were collected at T0 (baseline) and T1 (30 days) after non-surgical periodontal treatment and analyzed by real-time polymerase chain reaction (qPCR). In the results, in T0 (32%) of the patients had the EBV virus present in saliva with a quantitative average of 84.516,3 cp/ml. For the T1 period (42%) of the individuals included in the research were detected with EBV present in saliva with a quantitative average of 91.536,90 cp/ml. During this period, positive and significant influences for periodontal parameters in GI and PI ($p < 0.0001$) were detected. In the conclusion of the present study, non-surgical periodontal treatment improved the clinical status of periodontal inflammation in patients with CKD undergoing hemodialysis with chronic periodontitis (CP), however, it did not influence the EBV viral load present in the saliva of this population.

Keywords: Epstein-Barr Virus. Periodontal Disease. Chronic kidney diseases.

1 INTRODUÇÃO

O vírus Epstein-Barr (EBV) do gênero *Lymphocryptovirus*, subfamília *Gammaherpesvirinae*¹, foi descoberto em 1964 por microscopia eletrônica de células cultivadas de tecido de linfoma de Burkitt por Epstein, Achong e Barr.² O vírus pertencente a família dos herpesvírus (HHV) que são classificados em 8 grupos: Vírus Herpes simplex tipo 1 (HSV-1); Vírus Herpes simplex tipo 2 (HSV-2); Varicela-zóster (VZV) (Herpesvírus humano tipo 3 HHV-3); Vírus Epstein-Barr (EBV) (Herpesvírus humano 4 HHV-4); Citomegalovírus (CMV) (Herpesvírus humano 5 HHV-5); Herpesvírus humano tipo 6 (HHV-6); Herpesvírus humano tipo 7 (HHV-7); Herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8).³

É um vírus que mantém uma taxa global de infecção em humanos acima de 90% que, uma vez infectados, permanecem latentes por toda a vida.^{4,5} A maioria dos indivíduos infectados com EBV toleram bem a infecção sem quaisquer outros sintomas após a infecção primária.⁶ No entanto, em estado de latência, esses vírus podem ser reativados a qualquer momento como resultado de imunossupressão, estresse, trauma, irradiação ultravioleta ou febre.^{7,8}

A transmissão do EBV é mais comum pelo contato com secreções respiratórias, principalmente por transferência salivar contendo células B infectadas, que promovem o acesso e a entrada nas células reticuloendoteliais da árvore respiratória superior⁹, tendo também como outros meios de transmissão as vias sanguíneas, sêmen durante o contato sexual, transfusões de sangue e transplantes de órgãos.¹⁰

Os sintomas da infecção por EBV variam amplamente com base na idade e no estado imunológico do paciente. A maioria das infecções em crianças são benignas e frequentemente subclínicas. Em uma fase aguda da infecção o EBV apresenta-se como uma doença respiratória viral febril, que não é distinguível da doença associada a outros patógenos virais comuns.¹¹

Adultos jovens com infecção primária por EBV podem desenvolver a mononucleose infecciosa^{9,12}, uma doença aguda que tem como característica pelo menos dois sinais e sintomas: petéquias palatinas, linfadenopatia cervical, febre e fadiga, sendo que esses estados podem variar de intensidade leve a grave, com curso de 2 a 6 semanas.¹³

Complicações mais graves como obstrução das vias aéreas superiores, meningoencefalite, faringite, anemia hemolítica e trombocitopenia, durante a fase aguda da infecção primária por EBV são pouco prováveis e com uma ocorrência em menos de 1% dos pacientes.¹⁴

Com os avanços na detecção viral por meio de tecnologias de reação em cadeia da polimerase (PCR) altamente sensíveis, esses métodos levaram à identificação e quantificação de muitos vírus diferentes na saliva, fluido gengival e amostras de secreções da garganta. Clinicamente, evidências apoiam um papel fundamental para patógenos virais em pacientes imunocomprometidos infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e/ou pacientes com Doença Renal Crônica (DRC), no desenvolvimento de doenças orais incluindo lesões intraorais, doença periodontal (DP) e desenvolvimento de tumores orais.¹⁵

Pacientes com DRC apresentam alterações imunológicas importantes pois os rins param de funcionar gradualmente (durante meses ou anos), diminuindo a capacidade desses órgãos filtrarem os resíduos metabólicos, elevando os níveis de uréia e substâncias tóxicas no sangue.¹⁶ Esses indivíduos são identificados com DRC ao apresentarem uma taxa de filtração glomerular (TFG) inferior a 60 ml/min/1,73 m², ou TFG maior que 60 ml/min/1,73 m², por um período igual ou superior a três meses, com evidência de lesão da estrutura renal.¹⁷ A DRC é classificada de 1 a 5 de acordo com TFG (mL/min/1,73m²): 1 - > 90 com proteinúria; 2 - 60 a 89 com proteinúria; 3a - 45 a 59; 3b - 30 a 44; 4 - 15 a 29; 5 - < 15 ou em diálise) tendo como principais causas o diabetes mellitus, glomerulonefrite e hipertensão crônica. O tratamento da doença inclui mudanças dietéticas, correção de complicações sistêmicas e diálises.¹⁸

Com a função renal afetada, a ocorrência de infecções oportunistas e conseqüentemente mortalidade dos indivíduos aumentam gradativamente, pois os HHVs presentes na cavidade oral de pacientes com DRC podem contribuir também para o agravamento da DP.

A DP é uma infecção crônica que afeta os tecidos de suporte dentário, osso alveolar e ligamento periodontal, causada principalmente por aumentos de bactérias gram-negativas, levando à mobilidade dentária e eventual perda dentária.¹⁹

Uma infecção ativa por EBV pode prejudicar a primeira linha de defesa periodontal dos neutrófilos e evitar a resposta linfocítica T, vital para eliminar e conter bactérias causadoras de periodontite.²⁰ Além disso, uma infecção ativa,

estimulam células a produzirem citocinas inflamatórias importantes para o agravamento de DP como: Interleucina-1, Interleucina-6, Interleucina-8, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), entre outras.⁸

Terapias periodontais não-cirúrgicas são reportadas na literatura de forma positiva como sendo um tratamento alternativo que pode levar a uma redução das taxas de detecção viral em locais infectados, melhora nas condições clínicas da gengivite e periodontite, porém, em paciente saudáveis e sem níveis quantitativos das cargas virais.²¹

Dessa forma, em nosso estudo tivemos como objetivo testar a hipótese de que o tratamento periodontal não-cirúrgico poderá ter influencia positiva ou negativamente na melhora das condições clínicas da DP, taxas de detecção e quantificação do vírus EBV em saliva de pacientes com DRC submetidos a hemodiálise (HD) por meio de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).

2 REVISÃO DE LITERATURA

Kamma, Contreras e Slots (2001)²², determinaram a presença subgengival dos vírus CMV, EBV e HSV1, em pacientes saudáveis com periodontite de início precoce e relacionaram a hipótese de que esses vírus estariam associados a doença. Dezesesseis pacientes receberam tratamento periodontal, e amostras de placa subgengival foram coletadas para a identificação de CMV, EBV e HSV1 por PCR. Foram detectados os vírus CMV em 59,4% dos sítios ativos e em 12,5% dos sítios estáveis, EBV em 43,8% dos sítios ativos e em 12,5% dos sítios estáveis e HSV-1 em 34,5% dos sítios ativos e em 9,4% dos sítios estáveis. Taxas de infecções concomitante com qualquer um dos 3 HHVs de testes foram reportadas em 43,8% dos sítios ativos e em 3,1% nos estáveis. Sendo assim, os autores concluíram nesses achados uma importante relação do CMV, EBV e HSV-1 na patogênese da doença periodontal, cujo resultado é a proliferação de bactérias patogênicas, sangramento da gengiva e ruptura do tecido periodontal.

Comparando os níveis e números de EBV na saliva total antes e depois do tratamento periodontal em 11 pacientes com periodontite, uma diminuição significativa do EBV foi observada após o tratamento em um estudo realizado por Idesawa et al. (2004)²³. No estudo, o EBV foi detectado em 48,5% dos pacientes com periodontite e em 15,6% de indivíduos saudáveis. Após terapia periodontal a quantidade detectada em saliva do vírus reduziu de $(9,46 \pm 5,40 \times 10^5 \text{ cp/ml})$ para $(9,01 \pm 4,80 \cdot 10^3 \text{ cp/ml})$, deduzindo que eliminação da inflamação pode contribuir para a diminuição do EBV salivar.

Kubar et al. (2005)²⁴, quantificaram níveis de EBV e CMV na bolsa periodontal e na gengiva adjacente usando a metodologia de qPCR em 20 indivíduos sistemicamente saudáveis, classificados em dois grupos de acordo com as condições clínicas periodontais. No grupo 1, nove deles foram diagnosticados como tendo periodontite agressiva (PA), e no grupo 2, onze pacientes como tendo periodontite crônica (PC). Nas avaliações dos resultados para PA e PC em amostras de tecidos subgengival/gengival, o EBV estavam presentes em (89% / 78%) e (46% e 46%) respectivamente e, para o CMV (78% e 33%) e (46% e 9%). Os resultados desse estudo demonstram uma elevada ocorrência de EBV e CMV em amostras de tecidos subgengivais e gengivais em lesões de PA em relação às lesões de PC. Isso sugere que o aumento nas contagens de HHVs dão suporte substancial a um papel

periodontopatogênico dos dois vírus em relação ao aumento da gravidade da doença.

Saygun et al. (2005)²⁵, detectaram altas cargas de DNA de EBV e CMV em saliva de pacientes saudáveis com PC que foram submetidos a terapia periodontal não-cirúrgico. Ensaio de qPCR foi usado para identificar e quantificar cópias de CMV e EBV na saliva. Uma taxa de detecção de EBV de 65% (13/20) foi identificada e a carga média viral foi de 105.850 cp/ml. Após terapia periodontal aplicada em 5 pacientes, com altas cargas virais (média de 238.000 cp/ml), as contagens de DNA do EBV reduziram para 33.860 cp/ml. Desta forma, os autores concluíram que as lesões periodontais constituem uma fonte importante de herpesvírus na saliva e que a terapia periodontal pode implicar na redução dos vírus.

Saygun et al., (2008)²⁶, buscaram associações entre vírus EBV em lesões de periodontite num total de 30 indivíduos sistemicamente saudáveis. Entre os pacientes participantes 15 tinham periodontite e 15 indivíduos eram saudáveis. Amostras de tecido subgengival e saliva foram coletadas e analisadas por qPCR. Como resultados, as análises apresentaram taxas de infecção de EBV de 9/15 (60%) para pacientes com periodontite e 2/15 (13%) em pacientes saudáveis e, uma contagem média de EBV de $7,1 \times 10^5$ (710.000 cp/ml) (intervalo: $2,1 \times 10^3$ - $8,3 \times 10^8$ cp/ml) em pacientes com periodontite e $1,72 \times 10^4$ (17.200 cp/ml) (intervalo: $2,4 \times 10^3$ - $3,2 \times 10^4$ cp/ml) em sítios saudáveis, relacionando de forma positiva a influência do EBV na periodontite.

Sunde et al., (2008)²⁷, apresentam um estudo com terapia antiviral em um paciente de 63 anos, sexo masculino, com diabetes mellitus tipo 2 controlada, doença periodontal, pertencente a um grupo de 25 pacientes. Amostras subgengivais foram coletadas nas regiões dos dentes 26 e 27 e quantificadas a níveis de 353.000 e 926.000 cp/ml consecutivamente através de qPCR. O paciente recebeu Valtrex® 500 mg por via oral duas vezes ao dia durante 10 dias e as amostras subgengivais foram coletadas após tratamento em 1, 5, 8 e 12 semanas. Na região do 26 a carga viral reduziu para 0, 70, 50 e 50 cp/ml consecutivamente e no 27 para 0, 0, 50, e 50 cp/ml consecutivamente. Clinicamente o paciente melhorou no primeiro mês após o tratamento, e a condição periodontal do paciente era estável 1 ano após a terapia.

Imbronito et al. (2008)²⁸ detectaram e avaliaram a possível associação dos HSV-1, EBV e CMV e patógenos periodontais em pacientes brasileiros

saudáveis com periodontite agressiva (PA) (grupo PA), PC (grupo PC), gengivite generalizada (GG) (grupo G) e indivíduos saudáveis (grupo C). Amostras de placas subgengivais foram coletadas com pontas de papel de 30 pacientes em cada grupo e analisadas por Nested PCR. As taxas de detecção para HSV-1, CMV e EBV foram 86,7%, 46,7% e 33,3% no grupo PA, respectivamente; em 40,0%, 50,0% e 46,7% no grupo PC, respectivamente; em 53,3%, 40,0% e 20,0% do grupo G, respectivamente; e em 20,0%, 56,7%, e 0,0% do grupo C, respectivamente. Segundo os autores, esses resultados estão de acordo com estudos anteriores que mostraram uma maior prevalência de EBV em amostras subgengivais combinadas de pacientes com PC em comparação com pacientes com gengivite.

Dowson et al. (2009)²⁹ determinaram a presença e a quantidade de DNA de CMV e EBV na saliva e placa subgengival em 65 indivíduos com periodontite moderada a grave. As amostras de saliva e placa subgengivais foram examinadas usando PCR quantitativo. O EBV foi detectado em 81,5% na saliva (53/65) e quantificado a 4.325 cp/ml em média dos indivíduos. Nas placas subgengivais de 72 pacientes (55 doenças, 17 saudáveis) a taxa de detecção foi de 44,6% (29/65). Em contrapartida, o CMV foi detectado em uma saliva (1,5%) e em uma amostra de placa subgengival (0,3%). A carga de DNA de EBV na saliva correlacionou-se positivamente com as quantidades detectadas na placa e com as quantidades detectadas em um número crescente de locais afetados. Segundo os achados a presença EBV na saliva não se correlacionou com aumento da gravidade da doença periodontal.

Grenier, Gagnon e Grenier (2009)³⁰, compararam a prevalência dos vírus CMV, EBV e HSV em 48 pacientes sistemicamente saudáveis, mas que apresentavam quadros de periodontite (n=31), gengivite (n=4) e periodotalmente saudáveis (n=13) por amostras de TCG (total de 300 amostras). O EBV foi detectado em 23% (7/31) das amostras de pacientes com periodontite, superior ao detectado em saudáveis (3%). Uma segunda parte do estudo comparou a prevalência do EBV em 4 participantes com periodontite 6 semanas após a raspagem e alisamento radicular. O tratamento periodontal reduziu taxa de detecção do EBV de 4 para 1 dos participantes. Segundo os autores, embora o tratamento periodontal tenha levado à eliminação quase completa do EBV na reavaliação, deve-se considerar que esses vírus podem estar periodicamente ativos e que a prevalência pode ser menor posteriormente, independentemente do tratamento.

Stein et al. (2013)³¹ tiveram como objetivo determinar a prevalência dos vírus HSV-1, EBV e CMV em amostras de placas subgengivais em 155 pacientes caucasianos, sendo 65 (grupo teste) com PA generalizada e 90 (grupo controle) sem DP todos sistemicamente saudáveis. Foram coletadas amostras de placas subgengivais das bolsas periodontais ou sulcos gengivais mais profundos de cada quadrante do arco para avaliação por qPCR. O DNA do HSV-1 e do CMV foi detectado em 1,5% dos testes e controles, enquanto o DNA do EBV esteve presente em 10,8% e 13,9%, respectivamente. Baseado nos dados, os pesquisadores não sugerem contribuição do HSV-1, EBV ou CMV para a periodontite agressiva na população alemã avaliada.

Morton et al. (2014)³² realizaram um estudo observacional prospectivo em 499 receptores de transplante renal adultos clinicamente estáveis, a fim de avaliar a prevalência de DNA de EBV e padrões subsequentes ao longo de um período de 1 ano. Fatores associados com EBV, sobrevida do paciente e do enxerto e incidência de doença linfoproliferativa pós-transplante (PTLD) foram analisados após 3 anos de acompanhamento. No transplante, 54/451 (12%) indivíduos recrutados com sorologia disponível eram soronegativos para EBV e 397 (88%) soropositivos. O DNA do EBV foi detectável (> 1000 cp/ml de sangue) em 153/499 (31%) indivíduos e indetectável em 346 (69%) na avaliação inicial. As cargas virais foram > 1000 cp/ml em 94 (19%), > 10.000 em 47 (9%) e >100.000 em 12 (2%) indivíduos. Durante o período de estudo de 1 ano, um total de 232/499 (46%) indivíduos tiveram uma ou mais amostras positivas. A sobrevida do paciente e do enxerto, a taxa de declínio da função renal e os sintomas relatados pelo paciente não foram significativamente diferentes entre os grupos positivo e negativo e a PTLD foi diagnosticado em seis indivíduos durante o acompanhamento médio de 482 dias do recrutamento. A ausência de PTLD em indivíduos soropositivos EBV, detectável no recrutamento, foi de 96,6% em comparação com 99,4% soronegativos.

Verdugo et al. (2015)²⁰ tiveram como objetivo comprovar a coinfeção herpesviral-bacteriana na periodontite periapical sintomática (PPS) e assintomática (PPA), avaliando possíveis associações com contaminações salivares periodonto patogênicas específicas em pacientes recebendo implantes dentários. Foram incluídos 33 pacientes que apresentavam periodontite apical sistemicamente saudáveis. Amostras de saliva foram coletadas e tecido de granulação (TG) de lesões periapicais foram retiradas usando curetas estéreis colocados em um

segundo recipiente. Trinta e dois (96,9%) dos 33 pacientes examinados tiveram resultados positivos para periodonto patógenos em amostras de TG. As amostras mostraram que 19 pacientes (57,6%) foram positivos para EBV e três pacientes foram positivos (9,1%) para CMV. A detecção de DNA bacteriano específico foi positiva em 27/33 (81,8%) das amostras de para *Tannerella forsythia* (Tf), 19/33 (57,6%) para *Prevotella nigrescens* (Pn), 15/33 (45,5%) para *Porphyromonas gingivalis* (Pg), 9/33 (27,3%) para *Treponema denticola* (Td), 4/33 (12,1%) para *Prevotella intermedia* (Pi), e 2/33 (6,1%) para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa). A PPS tinha 3,7 vezes mais probabilidade de ser infectada com EBV do que PPA e, 2,9, 2,1, 3,6 e 1,6 vezes mais probabilidade de estar infectada com *Treponema denticola* (Td), *Prevotella intermedia* (Pi), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), e *Porphyromonas gingivalis* (Pg) respectivamente. É provável que a contaminação salivar por EBV esteja associada à infecção viral e bacteriana por tecido de granulação, sendo que o estudo apóia uma associação causal entre infecção por EBV e PPS.

Kato et al. (2015)³³ investigaram a associação entre o EBV em pacientes japoneses com PC (n = 50) e IS (n = 26) sistemicamente saudáveis. Nos resultados, o EBV foi detectado em 80% dos locais com PS ≥ 5 mm (n = 25), 40% dos sítios com PS ≤ 3 mm (n = 25), e em 50% dos sítios em indivíduos saudáveis. Quanto as contagens de cp/ml de EBV os dados foram: $3,74 \times 10^3 \pm 2,83 \times 10^9$ cp/ml (≥ 5 mm); $4,37 \times 10^4 \pm 9,13 \times 10^6$ cp/ml (≤ 3 mm) e $1,27 \times 10^4 \pm 2,66 \times 10^8$ cp/ml (IS), correlacionando significativamente o vírus EBV com a periodontite nessa população.

Khosropanah et al. (2015)³⁴ pesquisaram a prevalência e a carga do vírus EBV e do CMV em tecido subgingival em 75 pacientes com PC sistemicamente saudáveis. A prevalência do EBV na saliva foi de 21,6% e para o CMV foi de 35,1%. Já a quantificação dos vírus mostrou uma maior carga na saliva de EBV na ordem de $(4913,14 \pm 19260,73)$ cp/ml em média e para CMV $(921,30 \pm 2158,63)$ cp/ml em média. Assim, os autores concluem que, o EBV e o HCMV podem desempenhar um papel efetivo na gravidade da doença periodontal e seu controle pode abrir caminho para um melhor tratamento periodontal.

Shah e Mehta (2016)²¹ investigaram a prevalência de HSV-1, HSV-2, CMV e EBV no FCG em pacientes controles saudáveis (n = 20), pacientes com gengivite (n = 40) e PC (n = 40), após terapia periodontal convencional com raspagem total da boca usando instrumentos ultrassônicos. No início do estudo,

havia uma diferença significativa entre indivíduos saudáveis (8/20, 40% HSV-1) (2/20, 10% EBV) e com gengivite (31/40, 77,5% HSV-1) (13/40, 32,5% EBV) e, entre pacientes saudáveis (8/20, 40% HSV-1) (2/20, 10% EBV) e com PC (37/40, 92,5% HSV-1) (25/40, 62,5% EBV) na ocorrência desses vírus ($P < 0,05$). Após terapia periodontal os níveis do vírus EBV em pacientes com gengivite reduziu significativamente de (13/40, 32,5%) para (2/40, 5%) e, em pacientes com PC a redução foi de (25/40, 62,5%) para (6/40, 15%) respectivamente. Desta forma, os autores concluíram que, neste estudo, o tratamento periodontal teve influência direta na redução das cargas virais dos vírus HHV em fluido crevicular gengival (FCG).

Vilibic-Cavlek et al. (2017)³ analisaram a prevalência de vírus da família HHV (HSV-1 e HSV-2, VZV, CMV e EBV) em pacientes croatas com DRC submetidos à HD. Foram obtidas 152 amostras de soros que foram testadas quanto à presença de anticorpos desses vírus para imunoglobulina M (IgM) e imunoglobulina G (IgG). Um grupo controle foi composto por 150 pessoas saudáveis. Foram utilizados os testes sorológicos usando um ensaio imunoenzimático (ELISA) ou ensaio imunofluorescente ligado a enzima (ELFA). Pacientes em HD apresentaram soropositividade para CMV significativamente maior em comparação aos controles (88,2% vs. 78,7%). Apesar das taxas do HSV-1 (85,5% vs. 80,0%) e VZV (99,3% vs. 96,0%) terem sido superiores, essas diferenças não alcançaram significância estatística. A prevalência de HSV-2 e EBV foram semelhantes em ambos os grupos (12,5% vs. 12,7% e 98,0% vs. 95,3%). Os autores concluíram que, mediante os resultados deste estudo, pacientes em HD pode significar um fator preditivo para a soropositividade de CMV.

Tonoyan et al. (2019)¹⁰ apresentaram em uma revisão de literatura, especificamente voltada ao EBV, se o vírus é apenas um agente oportunista que se beneficia de condições inflamatórias para se replicar ativamente, ou um patógeno capaz de desencadear e agravar doenças orais incluindo, líquen plano oral (LPO), doença periodontal e síndrome de Sjogren (SS). Como principais achados na revisão os autores citaram que genomas dos EBV e CMV ocorrem amplamente em diferentes tipos de periodontite em crianças, adolescentes e adultos. As presenças dos vírus em locais periodontais aumentam com a gravidade da doença. As células inflamatórias periodontais contêm sequências de ácido nucléico de HHVs. As lesões de periodontite positivas para HHVs também abrigam níveis aumentados de bactérias periodontopáticas. Também relataram que as células T citotóxicas são os

principais determinantes nos controles celulares das infecções agudas e, no entanto, havendo um desequilíbrio no sistema imunológico do hospedeiro e o vírus, pode haver doenças associadas ao EBV. No entanto, apesar de um grande número de dados de pesquisa convincentes, o papel etiopatogênico conclusivo do EBV no desenvolvimento e progressão da periodontite ainda precisa ser explorado.

Samiei et al. (2019)³⁵ avaliaram o estado sorológico e molecular da infecção viral por EBV em pacientes em HD através do teste de anticorpo IgG do antígeno do capsídeo viral EBV (VCA) e DNA do EBV antes do transplante. Um total de 84 soros coletados de pacientes foram testados quanto à presença de anticorpo IgG do Antígeno do VCA pelo ensaio enzimático ELISA. Todas as amostras foram submetidas a qPCR para detecção do vírus. Dos 84 pacientes em HD, 96,42% dos indivíduos mostraram-se positivos para anticorpo IgG anti-EBV, enquanto 3,58% foram negativos. O EBV foi detectado em 8,33% dos totais dos indivíduos. Diante dos resultados, os autores concluíram que há uma alta prevalência de soropositividade para EBV IgG entre os pacientes em HD e, por se tratar de pacientes imunocomprometidos, esses indivíduos apresentam alto risco de infecção latente nos linfócitos B, permitindo que o vírus evite a resposta imune do hospedeiro.

Pallos et al. (2020)¹⁹ avaliaram a presença da família do HHV (HSV-1, HSV-2, EBV, CMV, VZV, HHV-6, HHV-7 e HHV-8) na saliva e FCG em pacientes com DRC que apresentavam DP. O estudo transversal contou com 131 indivíduos, que foram divididos em três grupos de acordo com o estágio da doença renal. Grupo 1 (depuração de creatinina > 75 ml / min) pacientes sem doença renal (n = 24); Grupo 2 (depuração da creatinina de 11-75 ml / min) pacientes com doença renal (n = 67); Grupo 3 (depuração de creatinina <10 ml / min) pacientes em hemodiálise (n = 40). A saliva e FCG foram analisados PCR. Na associação entre o estágio da doença renal e a presença de HHV na saliva, verificou-se que HSV-1 e EBV foram mais prevalentes em Grupo 3 (pacientes em hemodiálise) em comparação com os Grupos 1 e 2. Os autores afirmaram a importância da avaliação das condições periodontais em pacientes com DRC em relação à presença dos HHVs, pois estes podem alterar o curso no agravamento dessas doenças.

Imai e Ogata (2020)³⁶, a partir de uma revisão da literatura, apontaram uma relação causal da Periodontite Crônica (PC) com o EBV. Segundo os autores, mais DNA de EBV é encontrado no FCG e saliva de pacientes periodontais do que em grupos de controle saudáveis, com uma prevalência maior de EBV em pacientes

com periodontite crônica correlacionada com a profundidade da bolsa periodontal. As infecções bacterianas e virais são mais frequentes em bolsas periodontais profundas com uma prevalência de *Pg*, *Tf*, EBV-1, CMV, *Aa*, e EBV-2 detectados em 95%, 75%, 72,5%, 50%, 12,5% e 10% dos locais, respectivamente, com profundidades de sondagem mais profundas do que 6 mm. Também foi abordado que, linfócitos B EBV-positivos e células epiteliais gengivais EBV-positivas são verificados no periodonto com periodontite crônica e que o tratamento antiviral resultou na diminuição da detecção de EBV e em uma melhora da condição periodontal. Essas observações sugerem uma relação causal entre periodontite crônica e EBV, bem como bactérias periodonto patógenas. Portanto, um novo termo “vírus periodonto patogênico” finalmente surgiu.

Abooj e Varma (2021)³⁷ avaliaram taxas de infecção pelo vírus EBV em pacientes com PC com e sem DM tipo 2 do que em indivíduos saudáveis através de análises de amostras de placas subgengivais. O estudo transversal envolveu um total de 120 pacientes divididos em três grupos; Grupo I (saudável), Grupo II (periodontite sem DM2) e Grupo III (periodontite com DM2). Apenas 2 (2,5%) amostras foram positivas para EBV no Grupo I, 16 (40%) amostras no Grupo II e 21 (52,5%) das amostras no Grupo III. Diante disso, os autores do estudo revelaram que, baseados em seus resultados, a incidência de infecção pelo vírus EBV foi predominantemente detectado em pacientes com periodontite e associado ao estado glicêmico de pacientes com DM tipo 2.

3 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito do tratamento periodontal não-cirúrgico na detecção e quantificação da carga viral de EBV em saliva de indivíduos brasileiros com Doença Renal Crônica (DRC) em hemodiálise (HD).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – UNISA **CAAE:** 45478615.1.0000.0081e o estudo foi realizado no setor de Hemodiálise Medirim, município de Cariacica, estado Espírito Santo sendo que, todos os pacientes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, com informações sobre a pesquisa e também ciência dos benefícios.

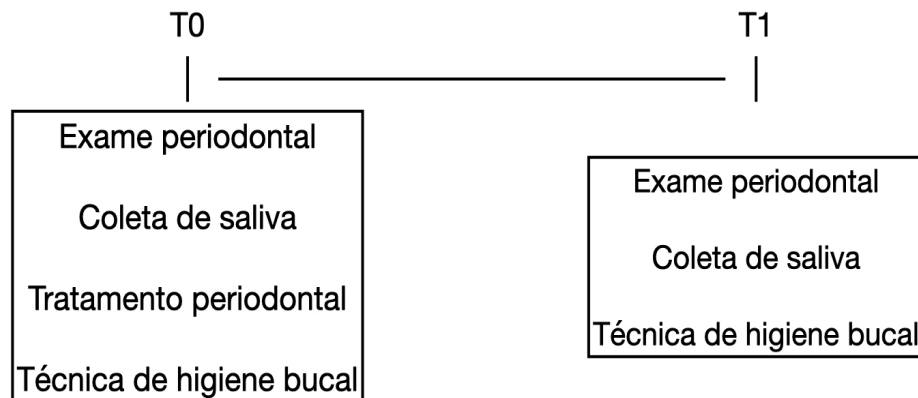
Para a inclusão na pesquisa os participantes necessitavam apresentar no mínimo 10 dentes na cavidade bucal, presença de doença periodontal e ter disponibilidade de tempo para a execução do trabalho. Foram excluídos pacientes: desdentados; ter recebido tratamento periodontal nos últimos 6 meses; soropositivo para o HIV, vírus hepatite C (HCV) ou hepatite B (HBV); fumantes; apresentar gengivite; gravidez ou lactante e pacientes transplantados.

Os pacientes da pesquisa foram avaliados quanto às condições periodontais por dois periodontistas previamente calibrados. Critérios de profundidade de sondagem (PS), perda de inserção (PI) quanto o nível clínico de inserção (NCI), foram obtidos em 6 sítios expressas em milímetros. A PS foi mensurada da margem gengival livre à base da bolsa periodontal usando uma sonda periodontal manual do tipo Williams. A PI foi obtida quanto ao NCI que foi obtido pela distância da junção esmalte-cimento (JEC) até a margem gengival (MG) somando à medida PS. Nesse caso: $NCI = PS + (JEC \text{ a } MG)$. Para o índice gengival (IG) foi medido (JEC a MG). Para índice placa (IP) bacteriana/biofilme dental visível usou-se como referências, quatro sítios (vestibular, mesial, distal e lingual/palatino). A presença de placa bacteriana/biofilme dental visível foi anotada da forma ausente e presente durante o exame periodontal.

4.1 COLETA DE SALIVA

As amostras de saliva foram coletadas no início da pesquisa (baseline) (T0) e 30 dias (T1) após a realização do tratamento periodontal não-cirúrgico (Figura 1). A coleta foi realizada com o uso de tubo salivette onde os pacientes retiravam de dentro do tubo um swab (algodão) mastigavam por 60 segundos e depois retornavam o swab nos tubos que eram identificados e posteriormente armazenados a -20°C .

Figura 1 - Desenho do estudo



Fonte: O Autor 2021

4.2 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA das amostras de saliva foi realizada usando um kit DNA Blood Mini QIAamp® (QIAGEN Group, Valencia, Califórnia, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. Foi adicionado em tubos de 2 ml da microcentrífuga o equivalente a 200 µl do conteúdo salivar que foram armazenados em eppendorf nas colunas QIAamp Mini spin, purificando o RNA e o DNA em paralelo quando ambos estão presentes na amostra. Em seguida, adicionou-se 20 µl de solução estoque de protease QIAGEN (ou proteinase K) e 200 µl de saliva em tampão AL na amostra, misturando imediatamente em vórtex por 15s, que foram incubadas a 56°C por 10 minutos e depois centrifugadas a 6000 xg (8000 rpm) por 1 min. Cuidadosamente foi aberta a coluna QIAamp Mini spin e adicionando 500 µl de tampão AW1 sem molhar a borda, e após fechado a tampa, centrifugou-se a 6000 xg (8000 rpm) por mais 1 min. Na sequência a coluna QIAamp Mini spin foi aberta e adicionando 500 µl de tampão AW2 sem molhar a borda, fechou-se a tampa e centrifugado a velocidade total (20.000 xg; 14.000 rpm) por 3 min. A quantificação das amostras foi realizada em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer v.3.0.1, Labtrade) seguindo os parâmetros de pureza e igualdade sugeridos pelo fabricante.

4.3 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE EBV POR PCR TEMPO REAL

A detecção do DNA viral de Herpesvírus humano 4 (EBV) foi realizada com protocolo adaptado de Fellner, 2014, por metodologia de qPCR quantitativo. Para a reação foi utilizado uma concentração final de 1x de TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Life Tech, EUA), 200 nM de primers (Forward e reverse) e 62 nM de sonda, e 5 µl de DNA extraído da amostra. A sequência dos primers e sondas estão dispostas na tabela 1.

Como controle interno da reação de extração e PCR foi utilizado ensaio TaqMan™ Gene Expression Assay, VIC primer-limited (Applied Biosystems, LifeTech, EUA) customizado do gene RNase P humana, seguindo as instruções do fabricante.

As reações foram feitas seguindo termociclagem de 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, e 40 ciclos de 95°C 15 segundos e 60°C por 1 minuto, no equipamento QuantStudio 6 flex (Applied Biosystems, LifeTech, EUA) para todas as reações descritas anteriormente. Os dados foram analisados com o software QuantStudio Design & Analysis Software v.2.6 (Thermo Fisher Scientific).

Tabela 1: Descrição das sequências dos primers e sondas utilizadas no PCR em tempo real para detecção do EBV e TTV.

Alvo	Id. Primers / Sondas	Sequência 5'- 3'
EBV	HHV4F_EBNA	CCGCTCCTACCTGCAATATCA
	HHV4R_EBNA	GGAAACCAGGGAGGCAAATC
	HHV4P_probe	FAM - TGCAGCTTTGACGATGG - MGB

Fonte: O autor 2021

EBV = Epsteinbar vírus ou Herpes vírus humano 4; FAM = 6-Carboxifluoresceína; MGB = Minor groove binder (MGB) and non fluorescent quencher (NFQ)

5 RESULTADOS

Um total de 19 indivíduos, sendo 3 do gênero feminino e 16 do gênero masculino com idades médias de $46,15 \pm 10,6$ anos em estágio 5 de TFG, foram incluídos na pesquisa e os dados coletados ocorreram em intervalos de tempo T0 e T1. Em T0, 32% dos pacientes tiveram o vírus EBV presente na saliva, enquanto que 68% dos pacientes testaram negativo para o vírus. Na análise quantitativa média a presença de EBV nesse período foi de 84516,3 cp/ml. Para o período T1, em 42% dos indivíduos incluídos na pesquisa o vírus EBV estava presente na saliva, enquanto que 58% dos indivíduos testaram negativo. Para a análise quantitativa média no período (T1) a presença de EBV foi de 91536,90 cp/ml (Tabela 2).

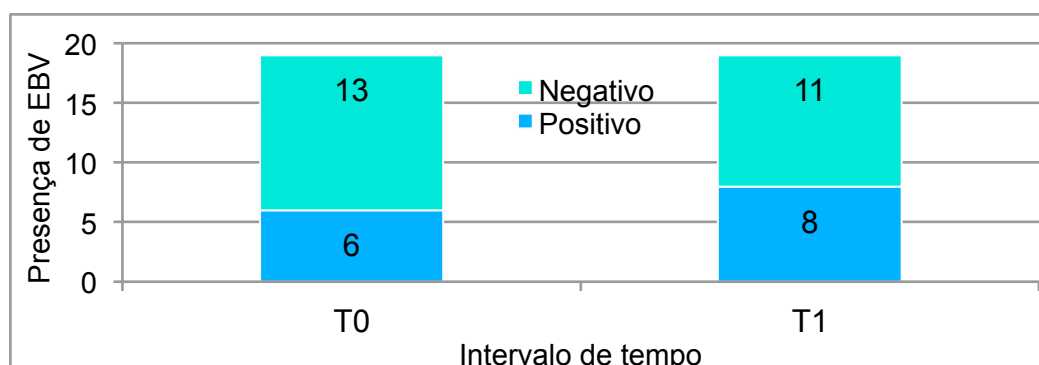
Tabela 2: Dados coletados referentes a presença do EBV ou não na saliva e sua quantificação em cp/ml.

	T0	T1
Positivo (%)	6 (32)	8 (42)
Negativo (%)	13 (68)	11(58)
Média (cp/ml)±DV	85516,3±185601,8	91536,9±27695,32
Mínimo (cp/ml)	966,02	9702,0
Máximo (cp/ml)	462508,42	454008,8

qPCR = reação em cadeia da polimerase em tempo real; cp/ml = cópias por mililitros T0 = baseline; T1 = 30 dias após tratamento periodontal não cirúrgico.

Fonte: O autor 2021

Gráfico 1 - Esquema gráfico de dados coletados referentes a presença ou não do EBV na saliva.



T0 = baseline; T1 = 30 dias após tratamento periodontal não cirúrgico.

Fonte: O autor 2021

O tratamento periodontal não-cirúrgico melhorou o estado clínico de inflamação periodontal de pacientes com DRC em hemodiálise com periodontite, apresentando melhora em IG ($p < 0,0001$) e IP ($p < 0,0001$) comparando T0 e T1 (Tabela 3).

Tabela 3: Avaliação dos Parâmetros clínicos periodontais em pacientes com DRC em hemodiálise com periodontite.

Parâmetros Periodontais	T0	T1	p
IG	0,36 ± 0,23	0,11 ± 0,15	<0,0001
IP	0,51 ± 0,31	0,03 ± 0,08	<0,0001
PI	3,50 ± 1,55	3,18 ± 1,44	0,5332
PS	2,30 ± 0,77	2,21 ± 0,71	0,3864

IG = Índice gengival; IP = Índice de placa; PI = Perda de inserção; PS = Profundidade de sondagem; T0 = baseline; T1 = 30 dias após tratamento periodontal não cirúrgico. (Teste Mann-Whitney, $p < 0,05$)

Fonte: (O autor 2021)

6 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que o tratamento periodontal não-cirúrgico realizado em pacientes com DRC em hemodiálise foi efetivo em reduzir sinais clínicos da inflamação periodontal, entretanto não teve influência na carga viral de EBV desses sujeitos.

O papel dos herpesvírus na doença periodontal vem sendo um importante tópico de pesquisas em todo mundo nesses últimos 20 anos. Várias publicações recentes demonstram relações positivas desses vírus na periodontite, corroborando para o agravamento da doença. Segundo Slots e Slots (2019)³⁸, em uma revisão com 50 estudos, a prevalência do vírus EBV em média atinge 45,5% da população estudada com periodontite agressiva e crônica, o que traz nossa pesquisa próximo a média com 42% dos indivíduos testados positivos.

O tratamento periodontal não-cirúrgico em nosso estudo não influenciou quantitativamente as cargas virais de EBV nos indivíduos nos T0 e T1, contrastando com resultados encontrados nas pesquisas de Idesawa et al., (2004)²³, Saygun et al., (2005)²⁵, após terapia periodontal realizada em pacientes, com altas cargas virais. A terapia periodontal reduziu os níveis do vírus EBV em pacientes com gengivite de 32,5% para 5% e, em pacientes com PC a redução foi de 62,5% para 15%) respectivamente segundo Shah e Mehta (2016)²¹. A não redução da carga viral em nosso estudo pode ser explicado pela heterogeneidade das pesquisas tanto quanto aos métodos utilizados, como também a população estudada, que em nossa pesquisa trata-se de pacientes sistemicamente comprometidos por DRC em estágio de hemodiálise.

Nikoobakht et al. (2011)³⁹ quantificaram níveis de EBV em saliva de pacientes que seriam transplantados sem doença periodontal instalada com uma média de $18027,35 \pm 7167,48$ cp/ml com taxa de detecção de 44,1%, o que pode relacionar níveis menores de cargas de EBV relacionado a não presença de DP instalada. Pallos et al. (2020)¹⁹ detectaram a presença de EBV na saliva de (36,6%) e (35,9%) no FCG considerando 3 grupos de pacientes sem doença renal, com doença e em hemodiálise. Ao considerar cada grupo isoladamente, pacientes em hemodiálise apresentaram uma maior taxa (52,5%) na saliva e (45%) no FCG.

Os vírus da família HHV têm sido associados a várias doenças com vários graus de evidência, sendo implicados em doenças congênitas, rejeição de

transplantes de órgãos, doença inflamatória intestinal, pneumonia, tumores e aterosclerose, contribuir para o desenvolvimento de diabetes melitus (DM) tipo 2 em idosos.¹¹ Abooj e Varma (2021)³⁷ detectaram taxas de EBV em EBV em 2,5% das amostras no Grupo I (saudável), 40% amostras no Grupo II (periodontite sem DM2) e 21 (52,5%) das amostras no Grupo III (periodontite com DM2).

Com relação às diferenças étnicas, nosso estudo apresentou taxas semelhantes (32% T0 e 42% T1) a outros pesquisados em diferentes países no mundo. Wu et al. (2006)⁴⁰ estudando uma população chinesa com PC, gengivite e indivíduos periodontalmente saudáveis, as frequências de infecção foram 47,7%, 24,6% e 16,7% para EBV. Rotola et al. (2008)⁴¹ detectou taxas de EBV em 50,0% das amostras de pacientes Italianos com periodontite. Das, Krithiga e Gopalakrishnan (2012)⁴², na Índia, detectaram EBV em 32% dos locais com periodontite crônica e periodontite agressiva nos indivíduos estudados. Imbronito et al., (2008)²⁸ detectaram em pacientes brasileiros saudáveis com periodontite uma taxa média de 33,3%.

Diferente dos estudos que acharam uma associação do EBV na DP, em nosso estudo não foi observado efeito do tratamento periodontal não cirúrgico na carga viral da saliva na população estudada. Possíveis explicações para os dados observados seriam a característica da população composta por pacientes com DRC em hemodiálise que podem ter associações com outras condições sistêmicas que podem ter influência na infecção por EBV, além de critérios rigorosos de inclusão e exclusão das amostras que foram aplicados com objetivo de eliminar os fatores de confusão que poderiam interferir na avaliação dos resultados deste estudo, resultando em uma redução de números de indivíduos. Outro fator limitante pode ser a ausência de grupo com sujeitos com DRC em hemodiálise portadores de DP que não receberam o tratamento periodontal não-cirúrgico, com o objetivo de avaliar o comportamento na quantificação de EBV na presença da DP.

7 CONCLUSÃO

No presente estudo, o tratamento periodontal não-cirúrgico melhorou o estado clínico de inflamação periodontal de pacientes com DRC em hemodiálise com periodontite crônica, entretanto, não influenciou na carga viral de EBV presente na saliva desta população.

REFERÊNCIAS

- 1 Kimura H, Ito Y, Suzuki R, Nishiyama Y. Measuring Epstein-Barr virus (EBV) load: the significance and application for each EBV-associated disease. *Rev Med Virol.* 2008 Sep-Oct;18(5):305-19.
- 2 Cohen JI. Epstein-Barr virusinfection. *N Engl J Med.* 2000 Aug 17;343(7):481-92.
- 3 Vilibić-Čavlek T, Kolarić B, Bogdanić M, Tabain I, Beader N. Herpes Group Viruses: a Seroprevalence Study in Hemodialysis Patients. *Acta Clin Croat.* 2017 Jun;56(2):255-261.
- 4 Kerr JR. Epstein-Barr virus (EBV) reactivation and therapeutic inhibitors. *J Clin Pathol.* 2019 Oct;72(10):651-658.
- 5 Slots J. Herpesviral-bacterial interactions in periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 2010 Feb;52(1):117-40.
- 6 Niller HH, Bauer G. Epstein-Barr Virus: Clinical Diagnostics. *Methods Mol Biol.* 2017;1532:33-55.
- 7 Cappuyens I, Gugerli P, Mombelli A. Viruses in periodontaldisease - a review. *OralDis.* 2005 Jul;11(4):219-29.
- 8 Slots J, Saygun I, Sabeti M, Kubar A. Epstein-Barr virus in oral diseases. *J Periodontal Res.* 2006 Aug;41(4):235-44.
- 9 Nowalk A, Green M. Epstein-Barr Virus. *Microbiol Spectr.* 2016 Jun;4(3).
- 10 Tonoyan L, Vincent-Bugnas S, Olivieri CV, Doglio A. New Viral Facets in Oral Diseases: The EBV Paradox. *Int J Mol Sci.* 2019 Nov 22;20(23):5861.
- 11 Slots J. Periodontal herpesviruses: prevalence, pathogenicity, systemic risk. *Periodontol 2000.* 2015 Oct;69(1):28-45.
- 12 Hislop AD. Early virological and immunological events in Epstein-Barr virus infection. *Curr Opin Virol.* 2015 Dec;15:75-9.
- 13 Taylor GS, Long HM, Brooks JM, Rickinson AB, Hislop AD. The immunology of Epstein-Barr virus-induced disease. *Annu Rev Immunol.* 2015;33:787-821.
- 14 Dunmire SK, Verghese PS, Balfour HH Jr. Primary Epstein-Barr virus infection. *J Clin Virol.* 2018 May;102:84-92.
- 15 Atyeo N, Rodriguez MD, Papp B, Toth Z. Clinical Manifestations and Epigenetic Regulation of Oral Herpesvirus Infections. *Viruses.* 2021 Apr 15;13(4):681.

- 16 Kim YJ, Moura LM, Caldas CP, Perozini C, Ruivo GF, Pallos D. Evaluation of periodontal condition and risk in patients with chronic kidney disease on hemodialysis. *Einstein (Sao Paulo)*. 2017 Apr-Jun;15(2):173-177.
- 17 Ammirati AL. Chronic Kidney Disease. *Rev Assoc Med Bras (1992)*. 2020 Jan 13;66Suppl 1(Suppl 1):s03-s09.
- 18 Proctor R, Kumar N, Stein A, Moles D, Porter S. Oral and dental aspects of chronic renal failure. *J Dent Res*. 2005 Mar;84(3):199-208.
- 19 Pallos D, Ruivo GF, Ferrari-Junior SH, Pannuti CS, Perozini C, Sarmiento DJS, Palmieri M, Souza ACMF, Tozetto-Mendoza TR, Doglio A, Braz-Silva PH. Periodontal disease and detection of human herpesviruses in saliva and gingival crevicular fluid of chronic kidney disease patients. *J Periodontol*. 2020 Sep;91(9):1139-1147.
- 20 Verdugo F, Castillo A, Simonian K, Castillo F, Farez-Vidal E, D'Addona A. Periodontopathogen and Epstein-Barr virus-associated periapical periodontitis may be the source of retrograde infectious peri-implantitis. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2015 Feb;17(1):199-207.
- 21 Shah R, Mehta DS. Prevalence of herpesviruses in gingivitis and chronic periodontitis: relationship to clinical parameters and effect of treatment. *J Indian Soc Periodontol*. 2016 May-Jun;20(3):279-85.
- 22 Kamma JJ, Contreras A, Slots J. Herpes viruses and periodontopathic bacteria in early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2001 Sep;28(9):879-85.
- 23 Idesawa M, Sugano N, Ikeda K, Oshikawa M, Takane M, Seki K, Ito K. Detection of Epstein-Barr virus in saliva by real-time PCR. *Oral Microbiol Immunol*. 2004 Aug;19(4):230-2.
- 24 Kubar A, Saygun I, Ozdemir A, Yapar M, Slots J. Real-time polymerase chain reaction quantification of human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in periodontal pockets and the adjacent gingiva of periodontitis lesions. *J Periodontal Res*. 2005 Apr;40(2):97-104.
- 25 Saygun I, Kubar A, Ozdemir A, Slots J. Periodontitis lesions are a source of salivary cytomegalovirus and Epstein-Barr virus. *J Periodontal Res*. 2005 Apr;40(2):187-91.
- 26 Saygun I, Kubar A, Sahin S, Sener K, Slots J. Quantitative analysis of association between herpesviruses and bacterial pathogens in periodontitis. *J Periodontal Res*. 2008 Jun;43(3):352-9.
- 27 Sunde PT, Olsen I, Enersen M, Grinde B. Patient with severe periodontitis and subgingival Epstein-Barr virus treated with antiviral therapy. *J Clin Virol*. 2008 Jun;42(2):176-8.
- 28 Imbronito AV, Okuda OS, Maria de Freitas N, Moreira Lotufo RF, Nunes FD. Detection of herpesviruses and periodontal pathogens in subgingival plaque of

patients with chronic periodontitis, generalized aggressive periodontitis, or gingivitis. *J Periodontol.* 2008 Dec;79(12):2313-21.

29 Dawson DR, Wang C, Danaher RJ, Lin Y, Kryscio RJ, Jacob RJ, Miller CS. Salivary levels of Epstein-Barr virus DNA correlate with subgingival levels, not severity of periodontitis. *Oral Dis.* 2009 Nov;15(8):554-9.

30 Grenier G, Gagnon G, Grenier D. Detection of herpetic viruses in gingival crevicular fluid of patients suffering from periodontal diseases: prevalence and effect of treatment. *Oral Microbiol Immunol.* 2009 Dec;24(6):506-9.

31 Stein JM, Said Yekta S, Kleines M, Ok D, Kasaj A, Reichert S, Schulz S, Scheithauer S. Failure to detect an association between aggressive periodontitis and the prevalence of herpesviruses. *J Clin Periodontol.* 2013 Jan;40(1):1-7.

32 Morton M, Coupes B, Roberts SA, Johnson SL, Klapper PE, Vallely PJ, Picton ML. Epstein-Barr virus infection in adult renal transplant recipients. *Am J Transplant.* 2014 Jul;14(7):1619-29.

33 Kato A, Imai K, Ochiai K, Ogata Y. Prevalence and quantitative analysis of Epstein-Barr virus DNA and Porphyromonasgingivalis associated with Japanese chronic periodontitis patients. *Clin Oral Investig.* 2015 Sep;19(7):1605-10.

34 Khosropanah H, Karandish M, Ziaeyan M, Jamalidoust M. Quantification of Epstein-Barr Virus and Human Cytomegalovirus in Chronic Periodontal Patients. *Jundishapur J Microbiol.* 2015 Jun 30;8(6):e18691.

35 Samiei RN, Mahmoudvand S, Shokri S, Makvandi M, Shahbazian H, Pirmoradi R, Shayanpur S, Makvandi K, Nowrozi S. The frequency of Epstein-Barr virus among hemodialysis patients, Ahvaz, Iran. *Iran J Microbiol.* 2019 Feb;11(1):75-79.

36 Imai K, Ogata Y. How Does Epstein-Barr Virus Contribute to Chronic Periodontitis? *Int J Mol Sci.* 2020 Mar 12;21(6):1940.

37 Abooj J, Varma SA. Prevalence of herpes virus in chronic periodontitis patients with and without type 2 diabetes mellitus: A clinico-microbiological study. *J Oral MaxillofacPathol.* 2021 Jan-Apr;25(1):141-146.

38 Slots J, Slots H. Periodontal herpesvirus morbidity and treatment. *Periodontol 2000.* 2019 Feb;79(1):210-220.

39 Nikoobakht M, Beitollahi J, Nikoobakht N, Aloosh M, Sahebamee M, Rezaeidanesh M, Biniiaz F. Evaluation of Epstein-Barr virus load in saliva before and after renal transplantation. *Transplant Proc.* 2011 Mar;43(2):540-2.

40 Wu YM, Yan J, Chen LL, Sun WL, Gu ZY. Infection frequency of Epstein-Barr virus in subgingival samples from patients with different periodontal status and its correlation with clinical parameters. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2006 Nov;7(11):876-83.

41 Rotola A, Cassai E, Farina R, Caselli E, Gentili V, Lazzarotto T, Trombelli L. Human herpesvirus 7, Epstein-Barr virus and human cytomegalovirus in periodontal

tissues of periodontally diseased and healthy subjects. J ClinPeriodontol. 2008 Oct;35(10):831-7.

42 Das S, Krithiga GS, Gopalakrishnan S. Detection of human herpes viruses in patients with chronic and aggressive periodontitis and relationship between viruses and clinical parameters. J Oral MaxillofacPathol. 2012 May;16(2):203-9.