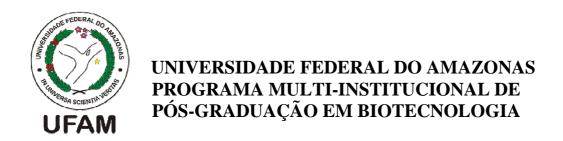
Avaliação por análise molecular da presença de vírus herpes simples em lesões diagnosticadas como estomatite aftosa recorrente na cavidade bucal em pacientes imunocompetentes.

LIONEY NOBRE CABRAL

MANAUS – AMAZONAS



LIONEY NOBRE CABRAL

Avaliação por análise molecular da presença de vírus herpes simples em lesões diagnosticadas como estomatite aftosa recorrente na cavidade bucal em pacientes imunocompetentes.

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós- graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área da saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ângela Delfina Bittencourt Garrido

MANAUS- AMAZONAS
2011

Ficha Catalográfica (Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Cabral, Lioney Nobre

C117a Avaliação por análise molecular da presença de vírus herpes simples em lesões diagnosticadas como estomatite aftosa recorrente em cavidade bucal de pacientes imunocompetentes / Lioney Nobre Cabral. - Manaus: UFAM, 2011.

77 f.: il. color.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, 2011.

Orientadora: Prof^a. Dra. Ângela Delfina Bittencourt Garrido

1. Estomatite aftosa recorrente 2. Vírus herpes simples 3. Reação em cadeia de polimerase I. Garrido, Ângela Delfina Bittencourt (Orient.) II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU 616.98(043.2)

LIONEY NOBRE CABRAL

Avaliação por análise molecular da presença de vírus herpes simples em lesões diagnosticadas como estomatite aftosa recorrente na cavidade bucal em pacientes imunocompetentes.

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós- graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área da saúde.

Aprovado em 31 de agosto de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof a Dra Ângela Delfina Bittencourt Garrido, Presidente

Universidade Federal do Amazonas

Prof ^a Dr^a Maria Fulgência Costa Lima Bandeira, Membro

Universidade Federal do Amazonas

Prof a Dra Nikeila Chacon de Oliveira Conde, Membro

Universidade Federal do Amazonas

Prof a Dra Juliana Vianna Pereira, Membro

Universidade Federal do Amazona

Prof Dr Paulo José Benevides dos Santos, Membro

Fundação CECON-Am.

Ao meu pai (in memorian) **Lino Cabral**, pelo exemplo de força, destemor, resistência e honestidade que ajudaram a construir grande parte do que hoje sou;

À minha mãe , **Maria Oneide**, pelo amor e sacrifício em prol de minha educação durante toda a sua vida para que este dia fosse possível;

À minha esposa, **Leyna** , pelo companheirismo, afeto , paciência e , principalmente, por compartilhar de meus sonhos;

A meus filhos : **Maria Clara, João Paulo, Lucas e Pedro Thiago**, por serem a essência de minha vida e a certeza de que o mundo pode ser melhor.

Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus Pai, ao Filho e ao Santo Espírito, que tornam novas e possíveis todas as coisas:

À Imaculada Mãe de Deus, **Maria Santíssima**, inspiração, presença e certeza em minha vida;

À minha mãe, pelo apoio, orações e novenas constantes ao **DIVINO PAI ETERNO** para que encontrasse aquilo que procurava;

À minha esposa e filhos que, mesmo privados de minha presença, eram fonte constante de oração, ânimo e apoio;

À minha irmã e sobrinhos, pelo afeto;

À minha orientadora, **Prof^a Dr^a Ângela Delfina B. Garrido**, pela motivação e pela possibilidade da realização deste trabalho;

À minha co-orientadora de direito e também orientadora de fato, **Prof^a Dra^a Cristina Maria Borborema dos Santos**, pelo acompanhamento, direção, dinamismo, disponibilidade e pelo sorriso motivador sempre presente, em momentos que nem sempre eram satisfatórios;

Ao meu técnico, **André Santos**, pelo trabalho incansável, pela busca comum e pela amizade construída;

À Coordenação do Curso de Odontologia da Escola Superior de Saúde da Universidade do Estado do Amazonas (ESA-UEA), nas pessoas de **Benedito Taveira e Tânia Chicre Alcântara** pela amizade e apoio dispensado;

Aos companheiros do Laboratório de Biologia Molecular-UFAM, **Daniele, Norma e Roberto**, pelo incentivo, discussões e idéias que em muito contribuíram no delinear do caminho;

Aos companheiros de Universidade e amigos pessoais : Paulo José Benevides dos Santos, Emílio Carlos Sponchiado Júnior, Tânia Cristina C. Alcântara e Lia Mizobe Ono, por terem suprido minha ausência nas disciplinas de Patologia Bucal e Semiologia Odontológica II, durante minhas férias forçadas para cumprimento de crédito.

Ao Programa Multi -Institucional de de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, pela oportunidade.

AGRADEÇO

Nada te perturbe, Nada te espante, Tudo passa, só Deus não muda. A paciência tudo alcança. Quem tem a Deus, nada lhe falta. Só Deus basta.

Santa Teresa de Ávila

RESUMO

A estomatite aftosa recorrente (EAR) é a condição inflamatória ulcerativa mais comum da mucosa bucal não-ceratinizada, possuindo etiologia ainda incerta e controvertida. Os vírus herpes simples 1 e 2 (HSV-1 e 2) infectam liticamente o epitélio desta mucosa gerando manifestação clínica semelhante a esta estomatite, porém em mucosa ceratinizada. Diante disso, o objetivo deste estudo foi verificar a presença de vírus herpes simples 1 e/ou 2 em úlceras de mucosa bucal não-ceratinizada de indivíduos imunocompetentes. Dezesseis pacientes foram avaliados na Policlínica de Odontologia da Universidade do Estado do Amazonas e serviço particular, apresentando úlceras em mucosa não - ceratinizada bucal e faríngea (um caso), descartada a possibilidade de etiologia química, física ou doença imunossupressora de base. Foram coletados esfregaços do centro e da periferia da lesão aftosa dos oito primeiros pacientes e dos últimos, além do raspado, 1 ml de amostra de saliva não estimulada presente na boca. Foi realizada Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) com iniciadores multi e específicos para cada vírus, após identificação pela mesma técnica da presença de DNA genômico nas amostras, e em nenhuma destas, de úlcera foi encontrada partícula viral, ocorrendo, no entanto, amplificação do fragmento de HSV-2 da amostra salivar de um dos pacientes que fora estudado isoladamente, em segundo momento . O indivíduo positivo para a amostra ao sentir novamente os sintomas, identificou a área acometida em soalho bucal, em fase ainda vesicular e fora feita a coleta imediata do esfregaço da lesão, ulcerada a pouco tempo, e também salivar, ocorrendo pela metodologia apresentada, a amplificação de material genético do vírus HSV- 2 na ferida coletada, não ocorrendo na de saliva . Concluiu-se com a pesquisa, que o HSV não foi identificado na maior parte dos pacientes estudados, excetuando o caso específico, cuja a coleta do material biológico da úlcera fora realizada em fase inicial da condição, concluindo que o HSV-2, infectante comum de mucosas genitais pode, em alguns casos, estar presente e ser potencial fator etiológico das úlceras aftosas recorrentes da cavidade bucal.

Palavras-chaves: Estomatite aftosa recorrente, Vírus herpes simples, Reação em cadeia de polimerase.

ABSTRACT

The recurrent aphthous stomatitis (RAS) is the most common inflammatory ulcerative disorder of no keratinized oral mucous, whose etiology is still uncertain and controversial. The herpes simplex virus 1 and 2 (HSV-1 and 2) infect litically the mucous epithelium generating clinical manifestation similar to RAS but in keratinized mucous. That said, the goal of this study was to verify the presence of herpes simplex virus 1 and/or 2 in ulcers no keratinized oral mucous of immunocompetent individuals. Sixteen patients were evaluated in the Polyclinic of Dentistry of the University of the State of Amazonas and particular service, showing ulcers in the no keratinized oral mucous and pharyngeal (one case), excluding the possibility of chemical, physics or immunosuppressive disease etiology. Swabs were collected from the centre and the periphery of aphthous lesion for the first eight patients and of the latter, in addition to scraped, 1 ml of sample of not stimulated saliva present in the mouth. Those samples were performed by Polymerase chain reaction (PCR) with multi and specific primers to each virus, after identification by the same technique of the presence of genomic DNA in the samples, and in none of these, of ulcer was found viral particle, occurring, however, the amplification fragment of HSV-2 salivary sample of one of the patients who had studied in isolation, the second time. The individual positive for the sample to feel again the symptoms identified the area suffered in the buccal floor in vesicular stage still out and made the immediate collection of smear, ulcerated lesion to shortly, and also salivate, occurring by methodology submitted, the amplification of genetic material of the virus HSV-2 in wound collected, not occurring in saliva. It was concluded with the search, the HSV has not been identified in most patients studied, except for the specific case, whose collection of biological material of the ulcer in initial stage of the condition, concluding that the HSV-2, genital mucous common infecting organism, can, in some cases, be present and be potential etiological factor of recurrent aphthous ulcers of the oral cavity.

Keywords: Recurrent aphthous stomatitis, Herpes simplex virus, Polymerase chain reaction.

LISTA DE FIGURAS

| FIGURA 1. Estrutura e composição do virus nerpes simples (HSV) |
|--|
| FIGURA 2. Produtos da PCR sendo submetidos à 165 V em uma corrente de 110 mA por 45 minutos |
| FIGURA 3. Após banho por 30 minutos em solução de Brometo de etídio a 0,5 g/ml, o gel foi examinado em luz ultravioleta (Vilber Loumart TFP-M/WL) |
| FIGURA 4. Perfil eletroforético das amostras de RU1 a RU9 e de R10 a R16 com controle positivo e branco em gel de agarose 2,5% corado com Brometo de etídio, sendo evidenciado um fragmento de 260 pb resultante da amplificação da região microsatélite (GATA) do cromossomo humano 15 com iniciadores ISO 2G (PONTES, 2003). M- marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen life Technologies). |
| FIGURA 5. Perfil eletroforético das amostras de RU1 a RU9, controle positivo e o branco em gel de agarose 1,5% corado com Brometo de etídio, sendo evidenciado em 5 delas, um produto de amplificação logo abaixo dos 400 pb (RU1, RU3, RU4, RU6 e RU9), tendo como referência o marcador de peso molecular (M) de 100 pb (Invitroge life Technologies) |
| FIGURA 6. Presença de mácula vesicular (seta amarela) e papilite lingual transitória (seta azul)48 |
| FIGURA 7. Visão em maior aumento da mácula vesicular (seta amarela) e papilite lingual transitória (seta azul) |
| FIGURA 8. Perfil eletroforético das amostras RU9 e RS9, sendo a primeira coletada da úlcera e a segunda da saliva do paciente, controle positivo e o branco em gel de agarose 1,5% corado com Brometo de etídio, evidenciando o produto de amplificação de 179 pb da amostra salivar, compatível com o fragmento de HSV, tendo como referência o marcador de peso molecular (M) de 100 pb (Invitrogen life Technologies) |
| FIGURA 9. Área ulcerada em mucosa não- ceratinizada de soalho bucal com diagnóstico compatível com estomatite aftosa recorrente, presente no paciente acompanhado de onde foi coletado o esfregaço para PCR |
| FIGURA 10. Perfil eletroforético das amostras R2U e R2S, juntamente com outras amostras de úlcera e saliva, controle positivo e o branco em gel de agarose 1,5% corado com Brometo de etídio. A amostra R2U fora coletada de úlcera e a R2S, de saliva, do paciente em questão, sendo a primeira positiva e a segunda negativa nesta reação. Evidencia-se o produto de amplificação de 179 pb da amostra de úlcera, compatível com o fragmento de HSV, tendo como referência o marcador de peso molecular (M) de 100 pb (Invitrogen life Technologies). Foi observado também um produto de amplificação pouco abaixo dos 400 pb na mesma amostra e tambem em outra (ROU), compatível, após sequenciamento, com fragmento de cromossomo 4 de DNA humano |
| FIGURA 11. Perfil eletroforético das amostras R2S E R2U, controle positivo para HSV-1 e branco em |
| gel de agarose 1,5 % corado com Brometo de etídio, evidenciando somente a amplificação do controle positivo em um produto de amplificação de 147 pb utilizando os iniciadores H1P32 e H1M32 (MARKOULATOS et al., 2001). Negativando todas as outras amostras. M- marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen life Technologies) |

LISTA DE TABELAS

| ΓABELA 1. Seqüência dos iniciadores HSV forward e reverse (Fonte : MADHAVAN et al., 1999) |
|---|
| TABELA 2. Sequência dos oligonucleotídeos forward e reverse : H1P32 / H1M32 para HSV-1 e H2P4 /H2P40 para HSV-2 (Fonte: MARKOULATOS et al. 2001) |
| ΓABELA 3. Características das lesões intrabucais da população de pacientes incluídos na pesquisa . * Primeira avaliação ** Segunda avaliação45 |

ABREVIATURAS

dNTP Desoxinucleotídeos trifosfatados

DsDNA DNA de cadeia dupla

EAR Estomatite aftosa recorrente

HHV Herpesvírus humano

HSV Vírus herpes simples

IgA Imunoglobulina A

IgG Imunoglobulina G

IgM Imunoglobulina M

PCR Reação em cadeia de polimerase

VP Proteína do capsídeo viral

VP5 Sub-unidade estrutural de todos os capsômeros do capsídeo viral

VZV Vírus varicela-zoster

μg Micrograma

μL Microlitro

mL Mililitro

μM Micromolar

mA Miliampere(s)

nm Nanomentro

j Joule

cm² Centímetro quadrado

mW Miliwatt(s)

mg Miligrama(s)

ESA/UEA Escola Superior de Saúde da Universidade do Estado do Amazonas

DST Doença sexualmente transmissível

SUMÁRIO

| 1. | INTRODUÇÃO | 15 |
|----------------|---|----|
| 2. | OBJETIVOS | 18 |
| 2.2. | GERAL | 18 |
| 2.3 . | ESPECÍFICOS | 18 |
| 3. | REVISÃO DE LITERATURA | 19 |
| 3.1. | ESTOMATITE AFTOSA RECORRENTE | 19 |
| 3.2. | VÍRUS HERPES SIMPLES | 24 |
| 3.3. | HISTÓRIA NATURAL E CURSO CLÍNICO DA INFECÇÃO PELO | |
| | HSV-1 | 28 |
| 3.4. | FATORES RELACIONADOS À RECORRÊNCIA DO HSV | 32 |
| 3.5. | IMUNIDADE CELULAR E HUMORAL NA CAVIDADE BUCAL | 33 |
| 3.6. | HERPES VÍRUS SIMPLES E EPITÉLIOS CERATINIZADOS E NÃO- | |
| | CERATINIZADOS | 34 |
| 4. | MATERIAIS E MÉTODOS | 36 |
| 4.1 . | POPULAÇÃO DE ESTUDO | 36 |
| 4.2. | CLASSIFICAÇÃO DO ESTUDO | 36 |
| 4.3. | SUJEITOS DA PESQUISA | 37 |
| 4.4. | COLETA DE MATERIAL | 38 |
| 4.5. | PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA PCR | 39 |
| 4.6. | PCR CONTROLE DO DNA | 39 |
| 4.6.1 . | SISTEMA DE REAÇÃO DA PCR | 39 |
| 4.7. | PCR PARA DETECÇÃO DE HSV | 40 |
| 4.7.1. | SISTEMA DA PCR PARA DETECÇÃO DE HSV | 40 |

| 4.7.2. | PCR PARA DETECÇÃO ESPECÍFICA DE HSV-1 E 2 | 41 |
|---------|--|-----|
| 4.7.2.1 | . SISTEMA DE PCR COM INICIADORES PARA HSV-1 | 41 |
| 4.7.2.2 | . SISTEMA DE PCR COM INICIADORES PARA HSV-2 | 42 |
| 4.8. | ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE | 43 |
| 4.9. | TRATAMENTO DOS PACIENTES INCLUÍDOS NA PESQUISA | 44 |
| 5. | RESULTADOS | 45 |
| 5.1. | TODOS OS INCLUÍDOS NO ESTUDO | 45 |
| 5.1.1. | CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS | 45 |
| 5.1.2. | CONTROLE DO DNA | .46 |
| 5.1.3. | REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE | 46 |
| 5.2. | ESTUDO DE CASO | 47 |
| 6. | DISCUSSÃO | 54 |
| 7. | CONCLUSÃO | 59 |
| 8. | REFERÊNCIAS 6 | 50 |
| 9. | APÊNDICES | 57 |
| 10. | ANEXOS. | .75 |

INTRODUÇÃO

A estomatite aftosa recorrente (EAR) é uma das patologias mais comuns do mundo e representa a mais ocorrente condição ulcerativa bucal. A prevalência relatada na população em geral varia de 5 % a 66%, com uma média de 20%. As hipóteses de sua patogênese são numerosas. Autores cogitam que a destruição da mucosa parece representar uma reação imunológica mediada por células T , porém sua etiologia ainda permanece obscura, com vários fatores sendo implicados: genéticos, imunológicos, químicos, medicamentosos, nutricionais, hematológicos, microbiológicos, estressores emocionais ou ansiogênicos, etc (COMPILATO et al, 2009; GURANSKA et al., 2000; GURENLIAN, 2010; MESSADI; YOUNAI, 2010; SCULLY; PORTER, 1989; SUBRAMANYAM, 2011; PORTER et al., 2000).

A EAR ocorre em mucosa de revestimento sem ceratina podendo ser do tipo menor, maior e herpetiforme, esta última classificação devido à semelhança com as infecções herpéticas ocorrentes em mucosa ceratinizada (GURENLIAN, 2010; SUBRAMANYAM, 2011). As lesões aparecem classicamente como uma úlcera rasa, redonda ou oval, com presença de pseudomembranas e um halo eritematoso, podendo variar de menos de 1 mm à mais de 1 cm de tamanho (MESSADI;YOUNAI, 2010), sendo seus diagnósticos diferenciais : Úlceras traumáticas, Síndrome de Reiter e Behçet, doença de Crohn, eritema multiforme, pênfigo vulgar, neutropenia e infecção secundária pelo vírus do herpes simples (GURENLIAN, 2010).

O vírus herpes simples (HSV) é membro de extensa e heterogênea família Herpesviridae, composta por inúmeros patógenos animais e humanos, como citomegalovírus (CMV), Epstein-Barr (EBV) e varicela-zoster (VVZ). O membro mais conhecido desta família é o herpesvírus simples (HSV), um vírus DNA dividido em dois sorotipos, estruturalmente semelhantes : HSV-1 e HSV-2 (HHV 1 e HHV 2) . O primeiro, responsabilizado por causar infecções orais, periorais e, ocasionalmente, genitais e o segundo, predominantemente infecções genitais e eventualmente lesões orais e periorais (SMITH; ROBINSON, 2002; VARELLA et al.; 2005).

Os seres humanos são os únicos reservatórios naturais para esses vírus, que são mundialmente endêmicos e compartilham muitas características. Eles causam infecção primária em células do epitélio de revestimento e após isso ficam latentes no interior de células nervosas por toda a vida do indivíduo (RESKE et al, 2007). Essa infecção apresenta-se comumente por erupções vesiculares da pele e mucosa, ocorrendo de duas formas: sistêmica ou doença primária e localizada ou doença secundária (recorrente). Ambas as formas são autolimitadas, porém são comuns exacerbações da forma primária, porque o vírus, como mencionado, pode ficar latente no tecido ganglionar (MORI; NISHIYAMA, 2005).

O HSV-1 dissemina-se predominantemente através da saliva infectada ou de lesões periorais ativas. Este vírus se adapta melhor e atua de forma mais eficiente nas regiões oral, facial e ocular. Os locais envolvidos mais frequentemente são a faringe, região intraoral, os lábios, olhos e a pele acima da cintura. As infecções recorrentes podem ocorrer tanto no local da inoculação primária quanto em áreas adjacentes da superfície epitelial suprida pelo gânglio nervoso envolvido (MORI; NISHIYAMA, 2005; WOO; LEE, 1997).

O HSV-2 se adapta melhor às regiões genitais, sendo transmitido, predominantemente, através do contato sexual e envolve caracteristicamente a genitália e a pele abaixo da cintura. Podem ocorrer exceções a essas regras e o HSV-

1 pode ser observado em um padrão semelhante ao do HSV-2 e vice-versa. As lesões clínicas e as alterações teciduais produzidas pelos dois tipos são idênticas (SMITH; ROBINSON, 2002).

As infecções clinicamente evidentes pelo HSV exibem dois padrões. A exposição inicial de um indivíduo sem anticorpos contra o vírus é denominada infecção primária e esta ocorre frequentemente em faixas etárias jovens, sendo, na maioria das vezes, assintomática. A partir disso, o vírus segue pelos nervos sensitivos e é transportado para os gânglios homônimos associados (comumente o Trigeminal ou de Gasser) ou, menos comumente, para gânglios autonômicos, onde permanece em estado latente até ser reativado (RESKE et al., 2007; SILVA et al., 2002).

A localização mais comum de recidiva pelo HSV-1 é a borda do vermelhão e a pele adjacente dos lábios, infecção conhecida como herpes labial. A recorrência, no entanto, também pode afetar a mucosa bucal (WOO; LEE, 1997). Nos pacientes imunocompetentes, o envolvimento é quase sempre limitado à mucosa ceratinizada, aderida ao osso (gengiva inserida e palato duro). As lesões se iniciam como vesículas com 1 a 3 mm de diâmetro, que se rompem rapidamente e formam grupos de máculas eritematosas, que podem coalescer ou aumentar ligeiramente de tamanho. O epitélio afetado é perdido e desenvolve-se uma área de ulceração central amarelada (SILVA et AL., 2002).

Considerando que o primeiro contato com o HSV-1 se dá na primeira infância e que grande parte das infecções são subclinicas e garantem uma certa proteção à infecção de tecidos bucais pelo HSV-2, mas que este pode também comprometer esta região, devido à mudança dos hábitos sexuais (XU et al., 2006) e assim, ambos, HSV-1 e 2, podem infectar liticamente o epitélio e após isso permanecer latente nos gânglios nervosos do Trigêmeo, voltando a infectar de forma recrudescente, com sintomas

prodrômicos e etiologia semelhantes aos das úlceras aftosas recorrentes (alterações de resistência tecidual, mudanças hormonais, estímulos químicos, baixos níveis de ferro no sangue e eventos estressantes ou ansiogênicos) e principalmente, que a mucosa bucal é inervada por nervos sensitivos trigeminais cujo o gânglio mantém estes vírus em estado de latência, pesquisaremos a possibilidade de relação etiológica destes agentes, tão presentes na população de forma latente, com algumas manifestações clínicas de estomatite aftosa recorrente que ordinariamente acontece em mucosa de revestimento (não-ceratinizada) em grande parte dela (FRAIHA et al., 2002; PORTER et al., 2000; SUBRAMANYAM, 2011).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Verificar a presença do vírus HSV 1 e/ou 2 através de Reação em Cadeia de Polimerase em úlceras bucais diagnosticadas como estomatites aftosas recorrentes.

2.2 Específicos

- Estabelecer relação da infecção recorrente por vírus herpes simples com algumas manifestações de úlceras aftosas recorrentes em cavidade bucal.
- Postular uma nova possibilidade etiológica de alguns casos de úlcera aftosa recorrente em cavidade bucal.
- Apresentar um relato de caso sobre a presença de HSV-2 através de PCR em úlcera localizada em mucosa não ceratinizada em paciente imunocompetente.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Estomatite aftosa recorrente

A EAR, também conhecida como úlceras aftosas recorrentes (UAR), é a doença ulcerativa bucal mais comum em todo o mundo, sendo sua clínica caractrizada por úlceras redondas e ovais de diversos tamanhos, múltiplas e recorrentes com margens definidas por um halo eritematoso. Possui três formas principais, a mais comum é a menor (afta de Mikulicz), com pequenas ulcerações definidas, arredondadas, que são dolorosas e cicatrizam em 10 a 14 dias. Na forma maior (doença de Sutton ou periadenite mucosa necrótica recorrente) duram de 6 semanas a mais e frequentemente deixam cicatriz, e a terceira forma, a herpetiforme, de 7 a 10 dias, com a presença de múltiplas lesões que podem sofrer coalescimento (CHATTOPADHYAY; SHETTY, 2011; FRAIHA et al.,2002; GURENLIAN, 2010; MESSADI; YOUNAI, 2010).

A terminologia aftosa, vem do grego "aphtai" que significa queimar ou atear fogo e segundo relatos, Hipócrates já o usava há 2500 anos para se referir a estas úlceras dolorosas que afetavam a boca (SCULLY et al., 2002). Elas surgem exclusivamente em mucosa não-ceratinizada e podem ser precedidas por uma mácula eritematosa em associação aos sintomas prodrômicos de queimação, prurido ou pontadas (SCULLY et al., 2003; SUBRAMANYAM, 2011). Estudos afirmam sua maior ocorrência em adultos aparentemente saudáveis, do sexo feminino, abaixo dos 40 anos, leucodermas, de alto nível sócio-econômico e não fumantes (MESSADI; YOUNAI, 2010).

Embora as características clínicas da EAR sejam bem definidas, a etiologia precisa permanece incerta, controversa e multifatorial. Mecanismos imunes parecem desempenhar um papel importante, história familiar positiva é vista em um terço dos

pacientes e a predisposição genética é sugerida pela presença de um aumento da frequência de antígenos tipo A2, A11, B12 e DR2 em leucócitos humanos, assim como a herança de um alelo de interleucina 1 ou 6 (IL-1 ou IL-6) nos acometidos (GURENLIAN, 2010; MESSADI; YOUNAI, 2010; SUBRAMANYAM, 2011).

A imunidade celular e humoral com formação de complexos imunes pode ter importância no desenvolvimento da EAR, exemplo disso é o aumento dos linfócitos T citotóxicos nestes episódios. Estas células produzem Fator de necrose tumoral α (TNF- α), um dos principais mediadores responsáveis pela iniciação do processo inflamatório, por seus efeitos sobre a adesão celular no endotélio e quimiotaxia de neutrófilos, que na presença das ulcerações, possuem redução na sua atividade fagocítica na saliva e no sangue periférico (CHATTOPADHYAY; SHETTY, 2011).

Além desta resposta celular citotóxica, ocorre também um mecanismo mediado por Linfócitos B que envolve citotoxicidade dependente de anticorpos que gera a formação de imunocomplexos encontrados em espécimes de biópsias das úlceras, especialmente na camada espinhosa do epitélio, sendo na lâmina própria também evidenciadas vasculites complexas imunes ou leucocitoclásticas. Complexos imunes circulantes não foram evidenciados na vigência da doença (CERUTTI et al., 2011; MESSADI; YOUNAI, 2010).

Doenças auto-imunes da tireóide podem também ter relevância na etiopatogenia da EAR. Anticorpos circulantes e Linfócitos T citotóxicos reativos podem agir contra ceratinócitos após sua estimulação por um antígeno indefinido endógeno ou exógeno. Os ceratinócitos por este motivo, secretam citocinas (IL-2 e TNF-α) ativando Línfócitos T CD4+ auxiliares, que mobilizam as células citotóxicas previamente acumuladas que assim promovem dano direto ao epitélio de revestimento, o lesionando.

Vasculites complexas imunes leucocitoclásticas que ocorrem comumente na EAR são encontradas em pacientes com auto-imunidade de tireóide. São também evidenciadas, nos acometidos, maior prevalência de anticorpos anti-tireóide associados a uma disfunção tireoidiana mais elevada (OZDEMIR et al., 2011).

A presença de Células Natural Killer (NK) ativadas por interleucina 2 (IL-2) também pode desempenhar um papel na patogênese da EAR. O aumento da atividade destas células foi observado em lesões ativas seguida por redução desta durante períodos de quiescência clínica. A Interleucina 10 (IL-10), que normalmente estimula a proliferação epitelial durante a cicatrização estava em pequena concentração na úlcera, o que pode explicar a retardada reepitelização e cura prolongada (MESSADI; YOUNAI, 2010).

Diante da possibilidade etiológica multifatorial da EAR, outros contribuintes causais não-imunológicos, locais e sistêmicos tem sido identificados na doença. Estes incluem os fatores: Medicamentosos, químicos, ambientais, comportamentais, nutricionais, hematológicos e infecciosos (COMPILATO et al., 2009; MESSADI; YOUNAI, 2010; SUBRAMANYAM, 2011). Considerando a possibilidade destas ulcerações serem manifestação local de doença sistêmica vigente, Scully et al. (2002) sugerem que o termo EAR deve ser reservado somente para as lesões em pacientes sem doenças sistêmicas, enquanto àquelas com quadro clínico semelhante na presença de doenças sistêmicas devem ser classificadas como Estomatite aftóide recorrente (Úlcera semelhante à aftosa recorrente).

Dentre os produtos medicamentosos e químicos que podem causar a EAR, estão os antiinflamatórios não-esteróides, nicorandil (ativador de canais de potássio para tratamento de condições cardíacas isquêmicas), betabloqueadores, inibidores de enzima

conversora de angiotensina e drogas antiarrítmicas. O lauril sulfato de sódio, detergente usado em alguns produtos de saúde bucal, pode também dar origem à condição (HERLOFSON; BARKVOLL, 1996; MESSADI; YOUNAI, 2010). Os fatores comportamentais e ambientais relacionados, são: o trauma bucal, a cessação do tabagismo, a sensibilidade a alimentos (Ex: conservantes e agentes como ácido benzóico ou cinamaldeído), mudanças hormonais relacionadas ao ciclo menstrual e ansiedade ou estresse (MESSADI; YOUNAI, 2010).

A EAR é mais comum em não fumantes que em fumantes, pelo fato do tabaco aumentar a ceratinização da mucosa bucal, tornando a mucosa menos suscetível a outros agentes ambientais. Além disso, a nicotina e a cotinina (seu principal metabólito) ativa receptores acetilcolina-nicotínico presente nos macrófagos, reduzindo a produção de Fator de necrose tumoral α (TNF α), Interleucina- 1 e 6 que são citocinas próinflamatórias e aumenta a liberação da molécula antiinflamatória Interleucina-10, provocando com isso a redução da resposta inflamatória e assim, imunossupressão, prevenindo o desenvolvimento das úlceras (SUBRAMANYAM, 2011).

Embora a EAR possa afetar pessoas de qualquer idade, os primeiros episódios tendem a aparecer antes dos 30 anos em cerca de 80% dos casos, com redução de sua recorrência com o avançar da idade. Porém , quando a afta ocorre com freqüência em faixas etárias mais avançadas pode ser sugestivo de possível fator predisponente subjacente , sendo a lesão um sinal local de uma doença sistêmica mais complexa. Isto ocorre comumente em pacientes com deficiências hematológicas de elementos como ferro, ácido fólico e vitamina B12. Fato observado em família com história positiva para estas carências e presença sistemática de EAR, melhorando a condição com a reposição destes oligoelemento e vitaminas (COMPILATO et al., 2009; MESSADI; YOUNAI, 2010)).

Uma associação entre EAR e *Streptococcus viridans* foi sugerida com importância na patogênese da doença, estes agindo como antígenos estimulando uma reação imunológica local. Porém, estudos indicaram que estas bactérias não eram específicas para a condição (CHATTOPADHYAY; SHETTY, 2011; PORTER et al., 2000). *A Helicobacter pilori* foi detectada em tecido lesional através de PCR em 71,9 % das úlceras examinadas por Birek et al.(1999), concluindo os autores, estar ela relacionada com a patogenia da lesão. Porém, estudos posteriores demonstraram que a frequência de anticorpos IgG para esta bactéria não se mostrou aumentada nos pacientes acometidos pelas ulcerações onde eram detectadas (PORTER et al., 2000).

A etiologia viral tem também sido considerada para EAR. Studd et al. (1991), detectaram DNA de HSV-1 em duas de onze biópsias de úlceras orais recorrentes em pacientes com doença de Behçet. Em outro estudo foi observado em pacientes acometidos, elevados títulos de IgM contra Citomegalovírus (CMV) e Vírus do herpes humano- 3 ou varicela-zoster (HHV-3 ou VZV) comparados aos pacientes controle (CHATTOPADHYAY; SHETTY, 2011; PEDERSEN; HORNSLETH, 1993;).

O envolvimento do Vírus do herpes simples (HSV) tem sido estudado em particular. No entanto, as tentativas de cultivá-lo de biópsias lesionais foram negativas, seu antígeno não pode ser detectado em esfregaços e amostras de biópsia da úlcera e apenas cerca de um terço dos pacientes eram soropositivos para anticorpos HSV. Porém em alguns pacientes com EAR do tipo menor (afta de Mikulicz), por meio de hibridização local, foi demonstrado que parte do genoma de HSV-1 era transcrito em células mononucleares do sangue periférico (PEDERSEN;HORNSLETH, 1993).

Apesar de ser uma condição comumente auto-limitada, raramente resultando em complicações, a EAR pode evoluir, em alguns casos, de forma inusitada e com certa morbidade para o acometido. Scully (2002), relata dois casos de pacientes com aftas

menores com evolução dolorosa e manifestação de graves ulcerações resultando em osteítes com formação de sequestros do osso cortical subjacentes às lesões.

São os principais diagnósticos diferenciais da EAR ou das ulcerações aftosas recorrentes: Úlceras traumáticas, síndrome de Behçet, Reiter ou Marshall (febre periódica), doença de Crohn, eritema multiforme, pênfigo vulgar, neutropenia cíclica e infecção secundária por vírus do Herpes simples (GURENLIAN, 2010)

Ao contrário das infecções recorrentes por herpes simples, as úlceras na condição não são precedidas por vesículas, não demonstram células infectadas por vírus e se distingue da recrudescência herpética baseada em sua localização (EAR em mucosa não- ceratinizada/ Herpes secundário, em mucosa ceratinizada), presença de vesícula precedente e estudos laboratoriais. O autor destaca que normalmente os exames laboratoriais ou biópsias não são indicados para o diagnóstico da EAR, este sendo muitas vezes baseado na aparência clínica, sinais e sintomas, natureza recorrente do problema e a taxa de cura (GURENLIAN, 2010).

3.2. Vírus herpes simples

Os vírus do herpes simples constituem uma grande família de vírus, denominada $\it Herpesviridae$, caracterizados por um DNA envolvido por um capsídeo e um envelope (Figura 1), dividindo-se em 3 subgrupos: grupos α , grupos β e grupos γ (KUMAR et al., 2005).

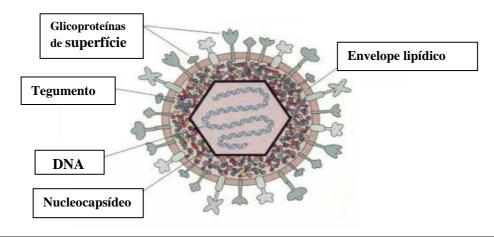


Figura 1. Estrutura e composição do vírus herpes simples (HSV).

Sete tipos de vírus do herpes simples produzem patogenicidade em humanos, entre os quais seis relacionam-se à doenças nas áreas da cabeça e do pescoço. O vírus de Epstein-Barr está relacionado a mononucleose infecciosa, linfoma de Burkitt, carcinoma nasofaríngeo e leucoplasia pilosa. O citomegalovírus associa-se à doenças das glândulas salivares e doenças sistêmicas em pacientes imunocomprometidos e o HHV 8 foi relacionado ao sarcoma de Kaposi (NEVILLE et al., 2009; REGEZI; SCIUBBA, 2000).

Os *alphaherpesvirus*, tem tropismo pelas células epiteliais e nervosas, dentre eles, o vírus varicela-zoster (VZV) causa catapora e herpes zoster (MORI; NISHIYAMA, 2005; PEDERSEN; HORNSLETH, 1992), o herpes simples tipo 1 (HSV-1ou HHV-I) foi responsabilizado por infecções orais, periorais e , ocasionalmente genitais e o último, herpes simples tipo 2 (HSV-2 ou HHV-2) está associado com infecções genitais e , ocasionalmente, lesões orais e periorais (MORI; NISHIYAMA, 2005; SMITH; ROBINSON, 2002).

Os vírus HSV-1 e 2 foram os primeiros *herpesvirus* a serem descritos, possuindo características biológicas particulares, tais como a capacidade de causar diferentes tipos de doenças, assim como estabelecer infecções latentes ou persistentes por toda a vida do hospedeiro e de serem reativados causando lesões que podem se localizar no sítio da infecção primária inicial ou próximas a ele, os caracterizando como fatores etiológicos da condição infecciosa mais comum do mundo (LAZARINI et al., 2006; XU et al., 2006)

O HSV-1 causa preferencialmente lesões orais e o HSV-2, infecções genitais, e ambos podem estabelecer uma infecção latente em gânglios nervosos e persistir por toda a vida no acometido (MORI; NISHIYAMA, 2005; SMITH; ROBINSON, 2002). As infecções primárias e recorrentes orais e genitais são geralmente autolimitadas em

indivíduos imunocompetentes, porém o HSV causa significante morbidade e mortalidade em imunocomprometidos, aumentando o risco de doença herpética severa. Ocorre uma relação complexa do vírus herpes simples 1 e 2 com o hospedeiro humano, este não podendo erradicá-lo completamente do organismo (KNIPE; CLIFFE, 2008).

Estes *alphaherpesvirus* DNA e membros da família *Herpesviridae* (HHV), possuem o DNA como material genético e são encapsulados. Os vírus desta família têm o seu material genético variando de 120 a 230 Kb dos quais 31 a 75% são guanina e citosina. No caso do HSV-1 seu genoma é de aproximadamente 150 Kb, sendo 68% deste material a base nitrogenada púrica e pirimídica citada (ROIZMAN;WHITLEY, 2001).

O genoma dos vírus herpes simples contém 80-85 áreas abertas de transcrição. Evidências bioquímicas e genéticas sugerem que 39 destes genes codificam proteínas que compõem o seu *virion*. Sua arquitetura no HSV, consiste de um envelope lipídico trilaminar com várias espículas glicoprotéicas, uma camada amorfa subjacente denominada tegumento, um capsídeo icosaédrico e um core contendo o DNA. O capsídeo icosaédrico funciona como um escudo de proteção ao DNA viral e contém 162 capsômeros, sendo este composto de uma proteína principal denominada VP5 e outras três menos abundantes: VP19C, VP23 e VP26. A proteína VP5 é a subunidade estrutural de todos os capsômeros e a VP19C e VP26 as que se encontram no espaço entre eles. A montagem destes capsídeos é semelhante a que ocorre em Bacteriófagos DsDNA (HOMA; BROWN, 1997).

Esses vírus provocam uma infecção lítica em células epiteliais e uma infecção latente em neurônios sensoriais. Durante a latência, os vírus persistem nos gânglios nervosos e quando reativados provocam uma nova infecção produtiva (recorrência) com potencial de transmissão a um novo hospedeiro (SMITH; ROBINSON, 2002). Knipe;

Cliffe (2008), postulam que tais vírus persistem a vida toda no hospedeiro infectado por terem a capacidade de interagir com histonas do DNA humano expressando a partir desta integração, genes que possibilitam desenvolver uma infecção produtiva (lítica) ou latente, dependendo do tipo celular infectado.

A formação de vesículas são os principais efeitos da infecção pelo HSV nas células epiteliais de revestimento da pele e mucosa. Isso ocorre pelo fato das células da camada espinhosa infectadas exibirem aumento nuclear, degeneração balonizante e acantólise (separação entre elas) pela perda do complexo de hemidesmossomos que as unem entre si. Estas vesículas intraepiteliais conseguem permanecer íntegras na pele podendo ser evidenciadas em seu estágio inicial. Na boca, devido à dinâmica própria do meio, logo se rompem e se manifestam em mucosa ceratinizada associada a osso (gengiva inserida e palato) como erosões e/ou máculas vermelhas (FRIEDMAN, 2006; NEVILLE et al, 2009; REGEZI; SCIUBBA, 2000).

O HSV-1, é geralmente transmitido durante a infância por meio de contatos nãosexuais, disseminando-se predominantemente através da saliva infectada ou de lesões periorais ativas, se adaptando melhor nas regiões oral, facial e ocular. Os sítios mais comumente envolvidos por este vírus são a faringe, áreas intra-bucais, lábios, olhos e pele acima da cintura, sendo o contágio através do contato direto entre pessoas (BARKVOLL; ATTRAMADAL, 1987; SCOTT et al., 1997a).

O HSV-2, em contraste, se adapta melhor às regiões genitais, ocorrendo em adolescentes e adultos sexualmente ativos e sendo transmitido, predominantemente através do contato sexual, provocando doença predominantemente na região genital e pele abaixo da cintura, aumentando de 2,2 a 3,4 vezes o risco para carcinoma cervical invasivo em mulheres positivas para DNA de HPV (CLEMENS; FARHAT, 2010). Porém, com a mudança dos hábitos sexuais, pode ser encontrado na pele e mucosas

associadas ao gânglio trigeminal (LOOKER et al., 2008; SMITH; ROBINSON, 2002; XU et al., 2006).

A prevalência de HSV-1 na população adulta em geral é de 60 a 95% sendo encontrado em aproximadamente 50% a 60 % de indivíduos da classe média e, em cerca de 90% de indivíduos das classes sócio-econômicas mais baixas (WOO; LEE, 1997). Muitas pessoas apresentam anticorpos contra o HSV-1, porém 40% destas têm susceptibilidade para desenvolver manifestações herpéticas secundárias (LOGAN et al., 1998). Classes socioeconômicas baixas estão correlacionadas com a exposição precoce. Nos países pobres e em desenvolvimento, mais de 50 % da população é exposta aos cinco anos de idade, 95% aos 15 anos de idade e a quase totalidade, em torno dos 30 anos de idade (NEVILLE et al., 2009). Clemens; Farhat (2010) , concluíram em estudo de soroprevalência de anticorpos contra ambos os vírus herpes simples no Brasil, que a prevalência do HSV-2 aumenta significativamente em grupos etários com início de atividade sexual.

3.3. História natural e curso clínico da infecção pelo HSV-1

Em sua história natural, a infecção herpética primária e o herpes labial recorrente são freqüentemente vistos na prática odontológica. A boca é um local muito comum de infecção primária pelo HSV-1. O espectro de infecção oral primária varia de subclínica ou infecções inaparentes até ulcerações extensas na mucosa jugal, língua e gengiva (HEDNER et al.,1990). O *virion* do HSV consiste de quatro componentes principais: core (DNA), capsídeo, tegumento (substância fibrilar) e envelope. Durante a infecção, o vírus é inoculado no hospedeiro pelas células da pele, lábio ou mucosa. Ocorre então a interação do DNA viral com um complexo de multiproteínas formado pela proteína

tegumentar VP16, o fator de transcrição octamérico de proteínas do hospedeiro (Oct 1) e outros fatores celulares (MOGENSEN;PALUDAN, 2001; SONG et al., 2000).

Em torno de 15 a 18 horas após a infecção, ocorre a transcrição dos genes do HSV-1 e então o vírus é encapsulado no núcleo da célula do hospedeiro. O vírus trafega no sentido retrógrado ao transporte axonal, conduzido por uma proteína associada ao microtúbulo denominada dineína, para o corpo celular neuronal atingindo seu núcleo, evoluindo para um ciclo lítico com auto-regulação ou estado de latência (DIEFENBACH et al., 2007). Na presença de fatores desencandeantes, genes líticos são expressos e os vírus são sintetizados no núcleo neuronal e transportados anterógradamente por outra proteína, quinesina, , ao axônio distal para a sua liberação em epitélio e assim, infecção recrudescente (CLEMENTI, 2000; DIEFENBACH et al., 2007; FLEMINGTON, 2001; KNIPE; CLIFFE, 2008; SCULLY, 1989; WEIR, 2001). A manifestação clínica permanece por cerca de 1 a 3 semanas e grande quantidade de partículas virais são liberadas na saliva por um período médio de duração de 7 a 10 dias (HOMA; BROWN, 1997; OAKLEY et al., 1997).

A transmissão do HSV ocorre por contato direto de indivíduos soro negativos com as lesões ou secreções das vesículas ou salivares, provenientes de indivíduos soropositivos para o HSV-1 (SCULLY, 1989). Segue-se assim, um período de incubação de 2 a 12 dias, quando a manifestação primária clínica aparece (CHRISTIE et al., 1998; NEVILLE et al., 2009; REGEZI; SCIUBBA, 2000).

A infecção primária ocorre usualmente nos primeiros anos de vida e é na maioria das vezes, cerca de 89 a 99 %, assintomática (BARKVOLL; ATTRAMADAL, 1987; NEVILLE et al., 2009; NISENGARD; NEWMAN, 1994; OAKLEY et al., 1997; REGEZI; SCIUBBA, 2000; SCOTT et al., 1997 a), embora possa produzir gengivoestomatite herpética aguda em crianças e faringites ou amigdalites em adultos.

A grande incidência de infecções pelo HSV-1 primária ocorre em crianças entre 6 meses a 3 anos de idade (WOO; LEE, 1997). O quadro clínico sintomático do herpes primário é caracterizado por ulcerações bucais generalizadas (NEVILLE et al, 2009; REGEZI; SCIUBBA, 2000; WHITLEY et al., 1998), gengivite, febre (39 a 40,5°C), linfoadenopatias cervicais (SCULLY, 1989), anorexia e irritabilidade (WHITLEY et al., 1998). Tal quadro tende a ser mais grave em adultos e, em muitas ocasiões, em crianças são observadas manifestações extrabucais, como crostas de sangue nos lábios (CHRISTIE et al., 1998; SCULLY, 1989). As lesões bucais aumentam de tamanho e desenvolvem áreas centrais de ulceração, recobertas por uma fibrina amarelada. As ulcerações podem coalescer e formar úlceras rasas e irregulares. Em casos brandos, geralmente, tais manifestações desaparecem dentro de 5 a 7 dias. Já nos casos mais graves, podem se estender por até 2 semanas (NEVILLE et al., 2009).

Segundo Whitley et al. (2002), as infecções primárias resultam em manifestações bucais por um período de no máximo 23 dias, com média de 7 a 10 dias. Os autores citam ainda como diagnósticos diferenciais da gengivoestomatite herpética : a herpangina, candidíase, mononucleose infecciosa, lesões decorrentes de radioterapia e quimioterapia e síndrome de Stevens-Johnson.

Durante a infecção primária, indivíduos soro negativos imunocompetentes desenvolvem resposta humoral e mediada por células para o HSV-1. A resposta humoral é iniciada com IgM transitória e persiste com anticorpos IgG e IgA. Existe assim, uma relação direta entre a presença destes anticorpos e a severidade da manifestação primária. Já nas recorrências, não existe uma relação de maior ou menor frequência e severidade das manifestações clínicas em relação aos isotipos de anticorpos (OAKLEY et al., 1997).

Segundo Christie et al. (1998), após a infecção inicial por HSV-1 na região orofacial, o vírus pode reativar e resultar em três formas diferentes de recorrência: herpes labial recorrente, herpes intrabucal recorrente e manifestações assintomáticas na saliva. Muitos pacientes são capazes de reconhecer sinais e sintomas prodrômicos da lesão recorrente, como queimação, sensação de dormência e formigamento (NEVILLE et al., 2009; OAKLEY et al., 1997), dor e prurido (SCOTT et al., 1997b; SCULLY, 1989) antes do desenvolvimento dos sinais clínicos do herpes labial recorrente. As recidivas também podem afetar a mucosa bucal. Nos pacientes imunocompetentes, o envolvimento é quase sempre limitado à mucosa ceratinizada, aderida ao osso (gengiva inserida e palato duro) já nos imunodeprimidos, as lesões tendem a ser severas e generalizadas (CHRISTIE et al., 1998; GOMEZ et al., 2001; OAKLEY et al., 1997).

Nos acometidos com bom estado imunológico, as alterações são sutis e os sintomas menos intensos. As lesões se iniciam como vesículas com 1 a 3 mm em mucosa com ceratina que se rompem rapidamente e formam grupos de máculas eritematosas, que podem coalescer ou aumentar ligeiramente de tamanho. O epitélio afetado é perdido, e desenvolve-se uma área de ulceração central amarelada. A cicatrização ocorre dentro de 7 a 10 dias (NEVILLE et al., 2009; SILVA et al., 2002).

Pacientes transplantados de medula óssea ou órgãos diversos, mal nutridos, portadores de tumores malignos ou afetados por quadros de imunodeficiência são mais susceptíveis de desenvolverem lesões intrabucais recorrentes graves de herpes (BARRETT et al., 1986; OAKLEY et al., 1997; WOO; LEE, 1997). Nestes pacientes as ulcerações locais são mais extensas, causando dor considerável e aumentam a ocorrência de superinfecções por bactérias e fungos. As lesões são na maioria das vezes atípicas e demoram a cicatrizar, cerca de 28 dias (GOMEZ et al., 2001; OAKLEY et al.,

1997). Recorrências em pacientes imunocompetentes são normalmente labiais e raramente intrabucais (FRIEDMAN, 2006).

Existem crescentes evidências de muitos indivíduos, particularmente crianças, que periodicamente apresentam HSV-1 na saliva sem o desenvolvimento de nenhum sinal ou sintoma clínico (LEWIS, 2004; SILVA et al., 2005). Vários fatores podem ser responsáveis pela reativação deste vírus nos indivíduos susceptíveis. Os mais freqüentemente implicados são: o estresse emocional, doenças, luz solar, menstruação e trauma físico (LAMEY et al., 1997).

Como exames complementares para se diagnosticar infecção pelo HSV-1, Greenberg et al. (1969) usaram a cultura celular associada à análise do esfregaço e a sorologia. Bagg et al. (1989) usaram esfregaços para exame de imunofluorescência com um propósito de um diagnóstico mais rápido que a sorologia. Robinson et al. (1992) detectaram a presença do HSV-1 na saliva de pacientes usando a PCR. Tateishi et al. (1994) demonstraram uma maior sensibilidade da PCR em relação à cultura viral e também ressaltaram que a PCR depende de menor tempo, fato este, observado também por Llorente et al. (1998). Knaup et al. (2000) mostraram uma maior sensibilidade do *Nested*-PCR quando comparado à reação convencional.

3.4. Fatores relacionados à recorrência do HSV

Existem várias teorias sobre a reativação viral. A primeira é a teoria do ponto de gatilho na pele, surgida em 1970 (SCOTT et al., 1997b). Tal teoria sugere a possibilidade do HSV estar presente perifericamente na pele e nos tecidos bucais, próximos às extremidades distais das terminações nervosas. Esta teoria baseia-se na suposição de que o HSV é constantemente produzido nos gânglios e periodicamente

transportado para sítios distais via V nervo sensorial (nervo Trigêmio). Já a teoria de ponto de gatilho ganglionar sugere que a reativação do HSV requer um estímulo do vírus latente no gânglio, para que, posteriormente, o mesmo possa ser levado para a pele onde provocará as lesões. Nesta teoria o desequilíbrio entre a defesa do hospedeiro e a atividade viral levaria às manifestações de recorrência (COUNTRERAS; SLOTS, 2001; LOGAN et al., 1998).

Tem se estabelecido na literatura que inúmeros fatores podem causar a reativação do HSV-1. Debilidade orgânica, stress, luz solar, menstruação, traumas como de extração dentária, imunossupressão (BARKVOLL; ATTRAMADAL, 1987; CHRISTIE et al., 1998), descompressão do nervo trigeminal (SCULLY, 1989), estímulos químicos, febre, frio, fadiga, gravidez (BARKVOLL; ATTRAMADAL, 1987), mudanças hormonais (COUNTRERAS; SLOTS, 2001), terapias para câncer facial (quimioterapia e radioterapia), baixos níveis de ferro no sangue, radiação X (SCOTT et al., 1997b), idade avançada, alergias, alterações respiratórias (NEVILLE et al., 2009) tornam o vírus reativo, levando à recorrência (CHRISTIE et al., 1998).

3.5. Imunidade celular e humoral na cavidade bucal

A boca é a área limite da economia orgânica com o ambiente externo e importa que a competência imunológica local seja compatível com este espaço fronteiriço. Além das amídalas linguais e células imunocompetentes espalhadas por toda a lâmina própria da mucosa, responsáveis pela imunidade celular local, temos na contrapartida humoral a secreção salivar, com rico potencial antiviral (BASSET et al., 2003; DIVINE, 2003; FARNAUD; EVANS, 2003; TEN CATE, A.R., 2001).

Este potencial existe pela presença de anticorpos A, M e G provenientes da corrente sanguínea e da também imunoglobulina A secretora, dimérica, produzida na própria glândula salivar , altamente efetiva contra Rhinovirus e Poliovírus (CHILDERS et al., 2003; DIVINE, 2003; NIEUW AMEROGEN; VEERMAN, 2002). Este anticorpo, o mais abundante nas secreções mucosas, deve sua efetividade à capacidade de transcitose em células epiteliais, ou seja, ao tráfego intracelular nos ceratinócitos dentro de vesículas (CERUTTI et al., 2011). Também concorre para a ação antiviral, as mucinas de alto e baixo peso molecular, que em virtude do seu alto conteúdo em prolina (o que a torna semelhante ao colágeno) formam uma camada pseudomembranosa na mucosa podendo servir de proteção contra o HSV e também pela hidrocinética de seu fluxo (MANDEL, 1989; NIEUW AMEROGEN; VEERMAN, 2002; SOARES et al., 2004), que possibilita a suspensão nesta secreção dos produtos biológicos da sua ação de lavagem dos tecidos bucais.

3.6. Herpes vírus simples e epitélios ceratinizados e não - ceratinizados

Friedman (2006), postula um papel duplo da ceratina na patogênese do vírus herpes simples. Esta proteína fibrosa resistente que reveste a pele, órgão genital masculino e algumas partes da boca e genitália feminina, pode proteger o hospedeiro da infecção primária pelos vírus HSV mas, nas infecções recorrentes as protege da ação imunológica, esta ocorrendo de forma facilitada em mucosa não-ceratinizada. Isso foi confirmado por uma vacina anti-HSV utilizando a HSV-2 glicoproteína gD que mostrou ser significativamente protetora de herpes genital por HSV-1 e 2 em mulheres mas não em homens soronegativos, demonstrando que a resposta imune é mais eficaz

nos tecidos não ceratinizados da mucosa vaginal do que naqueles que contém a proteína de superfície, predominante no órgão sexual masculino.

Autores mencionam que tecidos ceratinizados são os sítios mais comuns para a infecção por HSV recorrente devido à função que a ceratina exerce na proteção do vírus contra uma resposta imune, principalmente a presente na superfície das mucosas, daí ser mais comum o isolamento do HSV de lesões ulceradas de mucosa de palato duro e gengiva inserida, ambas ceratinizadas, nas infecções recorrentes (CERUTTI et al. 2011; SMITH; ROBINSON, 2002).

A reativação dos vírus herpes simples nos neurônios ganglionares trigeminais (V par craniano) , os leva de volta à epiderme , através dos nervos sensoriais, bem abaixo das camadas epiteliais superficiais, sejam elas ceratinizadas ou não (FRIEDMAN, 2006).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Estado do Amazonas (ESA/UEA) de acordo com as exigências da Resolução nº 196/1996 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 2006) e recebeu aprovação em 12 de novembro de 2010, sob o processo N° 123/10-CEP/UEA.

4.1. População de Estudo

Este trabalho foi realizado com pacientes encaminhados a serviço particular na cidade de Manaus, estado do Amazonas, à Avenida Ayrão, número 850, Praça XIV de Janeiro e também àqueles encaminhados à disciplina de Semiologia Odontológica II da Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Amazonas, localizada na avenida Codajás sem número, bairro cachoeirinha, nesta cidade e estado, no período de novembro de 2010 a julho de 2011.

4.2. Classificação do estudo

Esta pesquisa possui natureza exploratória e descritiva, de variáveis predominantemente qualitativas e quanto ao escopo, tem grande profundidade e amplitude reduzida em função do baixo número de elementos de pesquisa.

Critérios de inclusão : Pacientes com as seguintes características:

- Maiores de 18 anos com presença de úlceras localizadas em tecido mole não ceratinizado com diagnóstico clínico de estomatite aftosa recorrente ou não, descartada etiologia traumática ou química;
- Os que já desenvolveram pelo menos uma recorrência de herpes labial; e

• Os que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Critérios de exclusão: Pacientes com as seguintes características:

- Portadores do quadro primário de infecção herpética por HSV-1 ou 2;
- Os que faziam uso de aparelhos ortodônticos, protéticos totais ou parciais removíveis;
- Os portadores de doença sistêmica imunossupressora;
- Os portadores de neoplasias malignas ou sob tratamento antineoplásico;
- Os Tabagistas;
- Os Etilistas crônicos;
- Os que faziam uso de drogas xerostômicas (ansiolíticos, antidepressivos, antihipertensivos, etc);
- Os usuários de ativadores de canais de potássio ou betabloqueadores, antiarrítmicos ou inibidores de enzima conversora de angiotensina; e
- os que não assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

4.3. Sujeitos da pesquisa

A amostra incluiu todos os pacientes de demanda espontânea e encaminhados aos serviços supracitados positivos para os critérios de inclusão, sendo realizada análise prévia clínica e tendo sido coletado material, primariamente somente de úlcera e a partir do décimo sujeito da pesquisa também de saliva, conforme descrição a seguir com o fim de identificar a presença de herpesvírus humano 1 e /ou 2 através de Reação em Cadeia de Polimerase.

No exame clínico inicial dos dezesseis indivíduos incluídos na pesquisa e, em avaliação posterior daquele que foi investigado em segundo momento em estudo de caso, foi observada a sintomatologia prodrômica, tempo de surgimento das úlceras (na percepção do próprio portador), número de úlceras presentes, freqüência com que ocorriam, classificação da dor presente no momento da consulta, tamanho da(s) lesão(s) e sua(s) localização(ões).

Relativo ao número, tamanho e padrão de dor das úlceras presentes foi utilizado os critérios descritos por Eisen (1998). A citar :

- 1. **Número:** Solitária, de 2 a 4 úlceras e mais de 4 (>4).
- 2. **Tamanho:** de 1 a 5 mm, de 5 a 10 mm, de 1 a 2 cm e maior que 2 cm (> 2 cm).
- 3. **Padrão de dor :** Ausente, leve, moderada e severa.

4.4. Coleta de material

Após a identificação de úlceras em mucosa não-ceratinizada, diagnosticadas clinicamente ou não como estomatite aftosa recorrente, úlcera aftosa recorrente ou afta , foi coletado, com auxílio de escovas de microbrush , material do centro e periferia da lesão, tendo sido em seguida acondicionados em microtubos Eppendorfs de 1,5 mL contendo 400 μL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM e EDTA 1 mM pH 8,0) e mantidos em temperatura ambiente. Em segundo momento, por razões expostas a seguir, além da coleta de material do centro e periferia da úlcera diagnosticada, foi coletada também a saliva do paciente com a afecção, sendo esta acondicionada da mesma forma supracitada.

4.5. Preparação das amostras para PCR

Aos $400~\mu L$ de tampão TE utilizados na coleta do material foram adicionados $400~\mu L$ de TPK com concentração de 10~mg/mL de proteinase K associada a $900~\mu L$ de TE e $100~\mu L$ de Tween de 10~a~20~%. A seguir esta mistura foi levada ao banho seco a 56° C por uma hora e depois a $100~^{\circ}$ C, por dez minutos .

4.6. PCR controle do DNA

Para certificar a integridade do DNA das amostras, as mesmas foram submetidos a reação de amplificação utilizando-se iniciadores ISO 2G descritos por Pontes (2003), que amplificam um segmento de 260 pb de uma região de microsatélite (GATA) do cromossomo humano 15.

4.6.1. Sistema da reação da PCR

O sistema de reação foi composto de : 2,2 μ L de H2O Milli-Q; 2,5 μ L de tampão 10 x (500 mM KCl e 100 mM Tris – HCL, pH 8,5); 2,5 μ L de MgCl₂ 50 mM, 2,5 μ L de dNTP (200 μ M de cada desoxinucleotídeo) 2,5 mM; 5,0 μ L do par de iniciadores ISO2G (5 pmol); 0,3 μ L da enzima *Taq* DNA polimerase platinum 5U/ μ L e 5,0 μ L da solução contendo a amostra de DNA, totalizando um volume final de 20,0 μ L.

As reações de PCR foram realizadas em aparelho termociclador "AB- Applied Biosystems", cumprindo o seguinte programa :

2 minutos à 95° C (Pré-desnaturação / Hot-Start)

40 segundos à 94° C para desnaturação

1 minuto à 60° C para anelamento

1 minuto e 30 segundos à 72° C para extensão

40 ciclos, com extensão final por 10 minutos à 60° C.

4.7. PCR para detecção de HSV

Para a detecção do HSV I e/ou II foram utilizados os iniciadores descritos por Cunningham e colaboradores (MADHAVAN, 1999) que amplificam uma região de baixo polimorfismo de ambos os vírus (Região VRL 23 do HSV I e VRL 18 do HSV II) tendo alta especificidade e sensibilidade para estes *alphaherpesvirus*, promovendo a amplificação comum de um fragmento de 179 pb .

| OLIGONUCLEOTÍDEOS | 5' → 3' |
|-------------------|----------------------|
| HSV FORWARD | ATCAACTTCGACTGGCCCTT |
| HSV REVERSE | CCGTACATGTCGATGTTCAC |

Tabela 1 : Sequência dos iniciadores HSV forward e reverse (Fonte : MADHAVAN et al., 1999).

4.7.1 Sistema da PCR para detecção de HSV

O Sistema de reação foi composto de: 13,60 μL de água milli-Q; 2,5 μL de tampão 10 x (500 mM KCL e 100 mM Tris-HCl, pH 8,5); 0,8 μL de MgCl2 50 mM, 0,5 μL de dNTP (200 μM de cada desoxinucleotídeo trifosfato) 10 mM; 2,5 μL do iniciador HSV forward (10 pmol); 2,5 μL do iniciador HSV reverse (10 pmol); 0,1 μL da Enzima *Taq* polimerase high-fidelity 5U/ μL e 2,5 μL da solução contendo a amostra de DNA, totalizando um volume final de 25 μL.

As reações de PCR foram realizadas em aparelho termociclador "AB- Applied Biosystems", cumprindo o seguinte programa :

2 minutos à 94° C (pré-desnaturação/ Hot-Start)

- 30 segundos à 94° C para desnaturação
- 45 segundos à 60° C para anelamento
- 60 segundos à 68 ° C para extensão
- 40 ciclos, com extensão final por 5 minutos à 68° C.

4.7.2 PCR para detecção específica de HSV-1 e 2.

Para a detecção do HSV-1 e 2 de forma específica, foi retirada a amostra novamente dos microtubos para a realização da PCR. Foram utilizados os iniciadores H1P32/H1M32 para amplificar 147 pb da região do genoma viral RL2 do HSV-1 e H2P4 e H2M40 para um produto amplificado de 227 pb da região UL28 do HSV-2 (MARKOULATOS et al., 2001).

| Oligonucleotídeos | 5' → 3' |
|--------------------------------|------------------------------|
| H ₁ P ₃₂ | TGGGACACATGCCTTCTTGG |
| H ₁ M ₃₂ | ACCCTTAGTCAGACTCTGTTACTTACCC |
| H ₂ P ₄ | CGCTTCATCATGGGC |
| H_2M_{40} | GTACAGACCTTCGGAGG |

Tabela 2 : Seqüência dos oligonucleotídeos *forward e reverse* : H1P32 / H1M32 para HSV-1 e H2P4/ H2M40 para HSV-2 (Fonte : MARKOULATOS et al., 2001).

4.7.2.1 Sistema de PCR com iniciadores para HSV 1

O Sistema de reação foi composto de: 13, 60 μL de água milli-Q; 2,5 μL de tampão 10 x (500 mM KCL e 100 mM Tris-HCl, pH 8,5); 0,8 μL de MgCl₂ 50 mM,

0,5 μ L de dNTP (200 μ M de cada desoxinucleotídeo trifosfato) 10 mM ; 2,5 μ L do primer H1M32 (10 pmol); 2,5 μ L do primer H1P32 (10 pmol); 0,1 μ L da Enzima *Taq* polimerase high-fidelity 5U/ μ L e 2,5 μ L da solução contendo a amostra de DNA, totalizando um volume final de 25 μ L.

4.7.2.2 Sistema de PCR com iniciadores para HSV- 2

O Sistema de reação foi composto de: 13, 60 μ L de água milli-Q; 2,5 μ L de tampão 10 x (500 mM KCL e 100 mM Tris-HCl, pH 8,5); 0,8 μ L de MgCl₂ 50 mM, 0,5 μ L de dNTP (200 μ M de cada desoxinucleotídeo trifosfato) 10 mM; 2,5 μ L do primer H2M40 (10 pmol); 2,5 μ L do primer H2P4 (10 pmol); 0,1 μ L da Enzima *Taq* polimerase high-fidelity 5U/ μ L e 2,5 μ L da solução contendo a amostra de DNA, totalizando um volume final de 25 μ L.

As reações de PCR foram realizadas em aparelho termociclador "AB- Applied Biosystems", cumprindo o seguinte programa :

2 minutos à 94° C (pré-desnaturação/ Hot-Start)

30 segundos à 94° C para desnaturação

45 segundos à 60° C para anelamento

45 segundos à 72° C para extensão

40 ciclos, com extensão final por 10 minutos à 72° C.

4.8. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com Brometo de etídio (1,0 µg/mL) por vinte minutos. O gel foi diluído em tampão TE (1x) e a cuba usada foi a International Biotechnologies MPA. Os produtos da PCR foram aplicados em tampão de amostra e submetidos a 165 V em uma corrente de 110 mA por 45 minutos (Figura 2).

A fonte utilizada foi a Amersham Pharmacia Biotech EPS 301. Após a corrida, as bandas foram vistas com o auxílio de um transiluminador (Vilber Loumart TFP-M/WL) (Figura 3) e fotografadas em câmera digital *Olympus* SP-500uz. Foi utilizado como referência o marcador de peso molecular de 100 pares de base Invitrogen life Technologies.



Figura 2 : Produtos da PCR sendo submetidos à 165 V em uma corrente de 110 mA por 45 minutos

O sinal de amplificação final deveria surgir como uma banda bem definida e individualizada no amplicon esperado, de acordo com os iniciadores utilizados, no gel de agarose a 1,5% corado pelo Brometo de etídio.

Em todas as reações foram utilizados controle positivo e negativo. O controle positivo de HSV-1 consistiu de uma amostra de herpes labial e o de HSV-2, de herpes genital, ambos confirmados por citologia esfoliativa e Reação de Cadeia de Polimerase gentilmente cedidos pelo laboratório de virologia do IMT-AM (Instituto de Medicina Tropical do Amazonas).



Figura 3 : Após banho por 30 minutos em solução de Brometo de etídio a 0,5g/ml, o gel foi examinado em luz ultravioleta (Vilber Loumart TFP-M/WL).

4.9. Tratamento dos pacientes incluídos na pesquisa

Todos os incluídos no estudo foram acompanhados e tratados conforme protocolo utilizado para esta condição.

5.RESULTADOS

5.1. Todos os incluídos no estudo

5.1.1. Características clínicas

As características clínicas presentes nos pacientes avaliados em consulta inicial e em avaliação posterior (utilizado em estudo de caso) estão discriminadas abaixo (Tabela 3) :

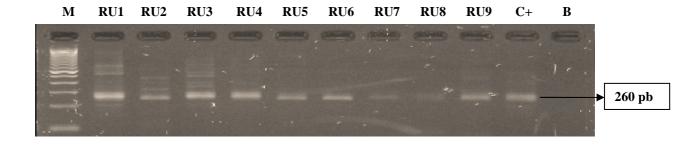
| Paciente | Prodromo | Tempo de surgimento da úlcera | N° Úlceras | Dor | Tamanho | Localização |
|----------|------------------|-------------------------------------|---------------|----------|---------|--|
| 1 | Ardência | 4 dias | 2-4 | Moderada | 1-5 mm | M.Jugal e Borda lingual |
| 2 | Prurido/Ardência | 3 dias | 2-4 | Moderada | 1-5 mm | Mucosa jugal e Soalho |
| 3 | Pontada | 5 dias | Solitária | Moderada | 5-10 mm | Soalho |
| 4 | Ardência | 5 dias | >4 | Severa | 1-5 mm | M. jugal, borda lingual e Soalho |
| 5 | Pontada | 4 dias | Solitária | Moderada | 5-10 mm | Mucosa jugal |
| 6 | Pontada/Ardência | 4 dias | >4 | Severa | 1-5 mm | Mucosa faríngea |
| 7 | Ardência | 5 dias | 2-4 | Moderada | 1-5 mm | Mucosa jugal |
| 8 | Pontada | 3 dias | Solitária | Moderada | 5-10 mm | Borda lingual |
| 9 | Ardência * | Não percebeu a presença | 2-4 | Ausente | 1-5 mm | Língua (dorso e borda) |
| 10 | Pontada | 3 dias | Solitária | Moderada | 1-5 mm | Soalho |
| 11 | Ardência | 4 dias | 2-4 | Moderada | 1-5 mm | Mucosa jugal |
| 12 | Ardência | 5 dias | 2-4 | Moderada | 1-5 mm | Mucosa jugal e Soalho |
| 13 | Prurido/Ardência | 4 dias | 2-4 | Moderada | 1-5 mm | Mucosa jugal e Soalho |
| 14 | Pontada | 3 dias | Solitária | Moderada | 5-10 mm | Mucosa jugal |
| 15 | Ardência | 3 dias | 2-4 | Leve | 1-5 mm | M. Jugal e Borda lingual |
| 16 | Ardência | 3 dias | 2-4 | Leve | 1-5 mm | Soalho e Mucosa jugal |
| 17 | Ardência ** | 3 horas | 2-4 | Moderada | 5-10 mm | Soalho e Borda lingual |

Tabela 3 : Características das lesões intrabucais da população de pacientes incluídos na pesquisa .

^{*} Primeira avaliação ** Segunda avaliação.

5.1.2. Controle do DNA

Após a preparação das amostras para PCR, procedeu-se o teste para verificar a integridade do DNA a ser analisado e foi obtido o seguinte resultado:



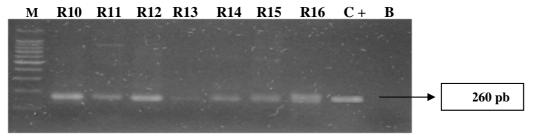


Figura 4 – Perfil eletroforético das amostras de RU1 a RU9 e de R10 a R16 com controle positivo e branco em gel de agarose 2,5% corado com Brometo de etídio, sendo evidenciado um fragmento de 260 pb resultante da amplificação da região microsatélite (GATA) do cromossomo humano 15 com iniciadores ISO 2G (PONTES, 2003). M- marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen life Technologies).

A amplificação em todas as amostras de um fragmento de 260 pares de base (Figura 4), juntamente com o controle positivo indicou que a coleta do material foi adequada pela integridade do DNA genômico amplificado.

5.1.3. Reação em Cadeia de Polimerase

Seguindo-se a PCR para controle do DNA genômico, foi realizada a reação para verificação da presença do DNA do HSV utilizando iniciadores multi: HSV forward e reverse (MADHAVAN et al., 1999) que amplificariam um fragmento de

179 pb de uma região de baixo polimorfismo de ambos os vírus HSV-1 e 2 , se presentes estivessem.

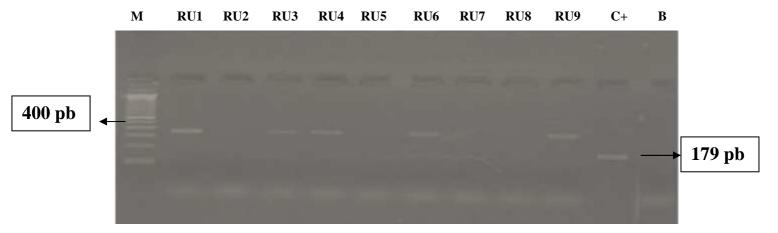


Figura 5 – Perfil eletroforético das amostras de RU1 a RU9, controle positivo e o branco em gel de agarose 1,5% corado com Brometo de etídio , sendo evidenciado em 5 delas, um produto de amplificação logo abaixo dos 400 pb (RU1,RU3, RU4,RU6 e RU9), tendo como referência o marcador de peso molecular (M) de 100 pb (Invitrogen life Technologies).

O fragmento amplificado das amostras em questão: RU1,RU3,RU4, RU6 e RU9 (Figura 5), não tiveram o amplicon esperado de 179 pb, mas um logo abaixo dos 400 pares de base, que foi purificado, seqüenciado e analisado através do programa BLAST, sendo compatível com a região CH15-135B10 do cromossomo 4 do genoma humano.

5.2. Estudo de caso

Dos oito primeiros pacientes, foram coletados somente raspados das úlceras de mucosa não-ceratinizada, todos sendo negativos em PCR para herpes simples. A partir do nono (RU9), além deste raspado, também negativo para HSV, fora coletada também amostra salivar, ocorrendo a partir desta primeira, coleta salivar de todos os outros sete avaliados. Não ocorrendo, no entanto, positividade para HSV em reação de cadeia de polimerase em nenhumas das outras amostras salivares coletadas, exceto no paciente de amostra RU9, primeiro a ter a saliva coletada.

Este indivíduo, positivo para amostra salivar, apresentava em primeira avaliação, sensação de ardência na área mais periférica da superfície dorsal da língua, que ao exame clínico se mostrava como pequenas mácula vesicular ainda não rompida e uma pequena úlcera em papila fungiforme (Figuras 6 e 7- maior aumento), estrutura revestida por epitélio não-ceratinizado localizada no dorso lingual, diagnosticada como papilite lingual transitória.

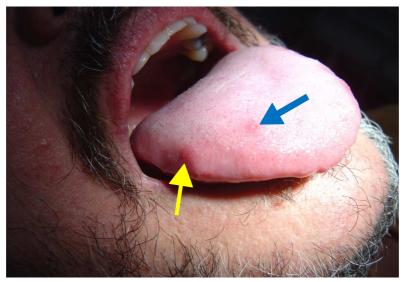


Figura 6 – Presença de mácula vesicular (seta amarela) e papilite lingual transitória (seta azul).

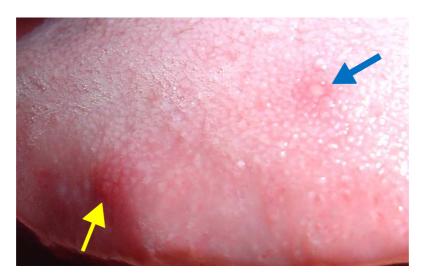


Figura 7 – Visão em maior aumento da mácula vesicular (seta amarela) e papilite lingual transitória (seta azul).

O portador mencionou que, vez em quando, em situação de estresse e excesso de trabalho, desenvolvia aftas na língua e eventualmente soalho de boca, mucosa labial e

jugal (bochecha) além de, eventualmente, desenvolver pequenas vesículas externas próximas ao lábio que se tornavam feridas, secundariamente . As coletas de raspado da úlcera papilar e saliva foram submetidas à reação em cadeia de polimerase, sendo encontrado na amostra da úlcera, resultado negativo para HSV e sendo positiva para o vírus, a salivar (figura 8).

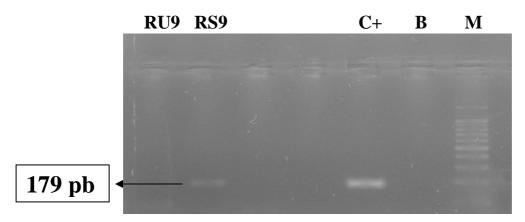


Figura 8 — Perfil eletroforético das amostras RU9 e RS9, sendo a primeira coletada da úlcera e a segunda da saliva do paciente, controle positivo e o branco em gel de agarose 1,5% corado com Brometo de etídio , evidenciando o produto de amplificação de 179 pb da amostra salivar , compatível com o fragmento de HSV, tendo como referência o marcador de peso molecular (M) de 100 pb (Invitrogen life Technologies).

Diante do resultado positivo para amostra salivar e considerando que o epitélio de revestimento não-ceratinizado não oferece a mesma proteção ao vírus contra a ação imunológica do meio quando comparado à mucosa ceratinizada (SMITH & ROBBINSON, 2002), o paciente foi acompanhado com o fim da realização da coleta se dar na fase mais inicial possível para possibilitar o encontro de carga viral residente antes da ação imunológica salivar. Para isso, o paciente foi orientado ao auto-exame periódico quando em condições de estresse ou ansiedade e, principalmente, a procurar o serviço quando estivesse sentindo os prodromos da condição, isso ocorrendo cerca de dois meses após a primeira coleta.

Desta vez o paciente queixou da sensação de formigamento, ardência e dolorimento no lado direito do soalho bucal e ao realizar o auto – exame identificou uma pequena bolha, segundo o próprio, e procurou o serviço para avaliação e coleta de imediato (1 a 2 horas depois), conforme orientado previamente.

Ao exame clínico, não foi evidenciado a presença da bolha descrita pelo indivíduo, mas de uma úlcera (Figura 9) e foram coletados esfregaços do centro e periferia da lesão e 1,5 ml de saliva presente não estimulada, conforme método previamente descrito para análise molecular posterior.



Figura 9 - Área ulcerada em mucosa não- ceratinizada de soalho bucal com diagnóstico compatível com estomatite aftosa recorrente, presente no paciente acompanhado de onde foi coletado o esfregaço para PCR.

As coletas foram submetidas à Reação em Cadeia de Polimerase , com os seguintes resultados :

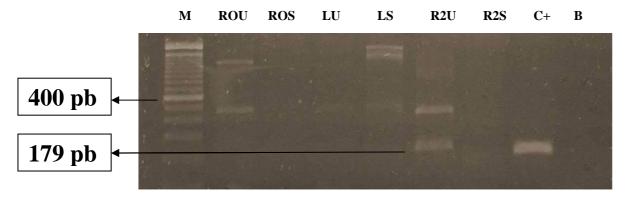


Figura 10 — Perfil eletroforético das amostras R2U e R2S, juntamente com outras amostras de úlcera e saliva, controle positivo e o branco em gel de agarose 1,5% corado com Brometo de etídio. A amostra R2U fora coletada de úlcera e a R2S , de saliva, do paciente em questão, sendo a primeira positiva e a segunda negativa nesta reação . Evidencia-se o produto de amplificação de 179 pb da amostra de úlcera , compatível com o fragmento de HSV, tendo como referência o marcador de peso molecular (M)de 100 pb (Invitrogen life Technologies). Foi observado também um produto de amplificação pouco abaixo dos 400 pb na mesma amostra e tambem em outra (ROU), compatível, após sequenciamento, com fragmento de cromossomo 4 de DNA humano.

Ocorreu amplificação de fragmento de vírus herpes simples e também de produto abaixo dos 400 pb (Figura 10), que foi purificado, sequenciado e quando analisado comparativamente através do programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), método mais utilizado para realizar busca de similaridades de sequências biológicas, com todas as sequências nucleotídicas depositadas no Banco de Dados Mundial de Nucleotídeos-GeneBank, foi compatível com a região CH15-135B10 do cromossomo 4 do genoma humano.

Após isso, para verificar a especificidade do agente viral amplificado na coleta do esfregaço da úlcera foi realizada uma Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) com iniciadores específicos para ambos os vírus utilizando os oligonucleotídeos: H1P32/H1M32, que amplificam a região RL2 do HSV1 com um produto de amplificação de 147 pares de base e H2P4/H2M40 que amplificam a região UL28 do HSV2 gerando um fragmento de 227 pb (MARKOULATOS et al., 2001). Tendo sido observado os seguintes resultados:

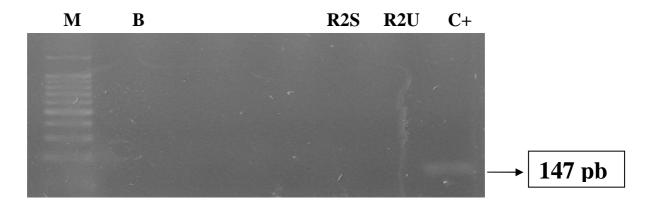


Figura 11- Perfil eletroforético das amostras R2S E R2U, controle positivo para HSV-1 e branco em gel de agarose 1,5 % corado com Brometo de etídio, evidenciando somente a amplificação do controle positivo em um produto de amplificação de 147 pb utilizando os iniciadores H1P32 e H1M32 (MARKOULATOS et al., 2001). Negativando todas as outras amostras. **M**- marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen life Technologies).

Não ocorreu amplificação quando utilizado iniciadores específicos para HSV-1 (Figura 11), ocorrendo amplificação de fragmento no tamanho de 227 pares de base quando utilizado iniciadores específicos para o HSV-2 (Figura 12). Foi identificada desta forma, por PCR neste paciente, a presença de vírus herpes simples tipo 2, infectante comum de mucosa genital, em úlcera de mucosa não ceratinizada de soalho bucal com aspecto clínico de estomatite aftosa recorrente.

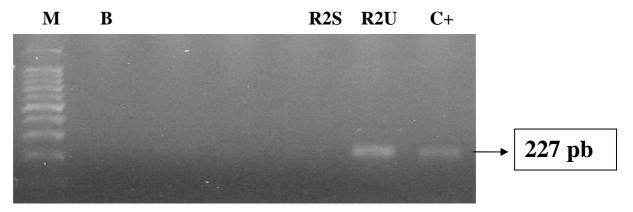


Figura 12 — Perfil eletroforético das amostras R2S e R2U, sendo a primeira coletada da saliva e a segunda da úlcera do mesmo paciente, controle positivo para HSV- 2 e branco em gel de agarose 1,5 % corado com Brometo de etídio, sendo evidenciado a amplificação da amostra da lesão ulcerada em compatibilidade com o controle positivo em produto de amplificação de 227 pb utilizando os iniciadores H2P4 e H2M40 (MARKOULATOS et al., 2001). M- marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen life Technologies).

6. DISCUSSÃO

O vírus HSV-1 é altamente prevalente, tipicamente contraído na infância e adolescência por contato direto via oral e nos países em desenvolvimento, infecta quase a totalidade da população adulta (CLEMENS; FARHAT, 2010; XU et al, 2006). O HSV-2, distinguindo do tipo 1, infecta predominantemente a mucosa genital e seu contágio se dá fundamentalmente por via sexual, ocorrendo predominantemente em adolescentes e adultos sexualmente ativos (CLEMENS; FARHAT, 2010; LOOKER et al., 2008; SMITH; ROBINSON, 2002).

O HSV-1 infecta liticamente o epitélio de pele e mucosas em infecção primária e fica latente em gânglios nervosos, sendo o gânglio trigeminal do V par craniano o acometido nas afecções da mucosa bucal (REGEZI; SCIUBBA, 2000; KNIPE; CLIFFE, 2008; NEVILLE et al. 2009). Devido à mudança de hábitos sexuais, o HSV-2 pode infectar a mucosa bucal com o mesmo comportamento fisiopatogênico do primeiro alphaherpesvirus (LOOKER et al., 2008; MORI; NISHIYAMA, 2005; NEVILLE et al.; 2009).

Após a infecção produtiva (lítica) no epitélio, os vírus HSV- 1 ou 2 trafegam no sentido retrógrado do axônio sensitivo para o corpo neuronal no gânglio relacionado onde fica latente, retornando novamente ao epitélio em situações de recrudescência, em decorrência de alterações imunológicas sistêmicas ou locais, estresse emocional, exposição ao frio ou calor intenso, etc (SCULLY, C. 1989; CLEMENTI, 2000; FLEMINGTON, 2001; WEIR, 2001), formando uma mácula vesícular e esta, devido à pouca espessura do teto epitelial e dinâmica bucal, se rompe gerando uma úlcera com a clínica podendo permanecer por 3 semanas , sendo que grande quantidade de partículas virais são liberadas precocemente na saliva permanecendo nela por um

período médio de 7 a 10 dias, de 1/3 à metade do tempo da manifestação clínica significativa (OAKLEY et al., 1997; HOMA; BROWN, 1997).

A reativação dos vírus herpes simples nos neurônios ganglionares trigeminais, os leva de volta à epiderme, através dos nervos sensoriais, bem abaixo das camadas epiteliais superficiais, sejam elas ceratinizadas ou não (FRIEDMAN, 2006), provocando nestas células, na camada espinhosa, aumento nuclear, degeneração balonizante e acantólise (separação destas células) pela perda dos complexo de hemidesmossomos que as unem entre si (NEVILLE et al., 2009; REGEZI; SCIUBBA, 2000) o que leva à formação da vesícula. Considerando uma mucosa sem presença de ceratina, o rompimento do teto vesícular se dá muito precocemente pela pouca espessura, esvaziando da área ulcerada a totalidade de carga viral pelo fato destes vírus estarem presentes nestas células acantolíticas (células de Tzanck), tornando a presença viral predominante na secreção salivar, sendo esta responsável pela homeostasia bucal (MANDEL, 1989; NIEUW AMEROGEN; VEERMAN, 2002; SOARES et al., 2004).

Com a fase lítica intraepitelial, a mucosa ceratinizada da boca protege melhor o vírus da ação imunológica celular e humoral que a mucosa não ceratinizada por, pelo menos, dois motivos: primeiro, pela transcitose de IgA dimérica trazida pela saliva à mucosa bucal, se dar facilmente em epitélio não-ceratinizado, possibilitando a ação desta imunoglobulina contra este agente intraepitelial presente nos ceratinócitos da camada espinhosa do epitélio de revestimento, possibilitando com isso a redução da concentração do vírus neste local (CERUTTI et al. 2011), e segundo, pelo fato do teto vesicular pouco espesso neste caso, se romper mais facilmente e permitir assim, a ação hidrocínetica e imunológica direta da secreção salivar (BASSET et al., 2003; DALE; KRISANAPRAKORNKIT, 2001; DIVINE, 2003; FARNAUD; EVANS, 2003; FRIEDMAN, 2006; MANDEL, 1989; NIEUW AMEROGEN; VEERMAN, 2002).

Discordando de Regezi; Sciubba (2000), Friedman (2006), Neville et al. (2009) que postulam que as recorrências em pacientes imunocompetentes são normalmente labiais e raramente intrabucais e quando o são, envolvem mucosa ceratinizada aderida ao osso (gengiva e palato duro) e acrescentando à posição de Christie et al. (1998), Lewis (2004) e Silva et al. (2005) que citam haver possibilidade de ocorrer manifestação salivar sem sintomatologia e sinais clínicos, acreditamos que estes podem não ser significativos, passando até mesmo desapercebidos pelo avaliador devido à sintomatologia pouco representativa em seu início para alguns afetados.

Isso ocorre pelo fato da descarga salivar destes vírus epitéliotrópicos ocorrerem em fases muito precoces do rompimento das vesículas do revestimento não-ceratinizado não existindo, desta forma, lesão exuberante, só eventual sintomatologia prodrômica. Assim é sugerido que a coleta de material biológico, das úlceras ou de saliva, em fase inicial de desenvolvimento da lesão é o momento mais adequado para a identificação de HSV, quando este é o fator etiológico da condição.

Após buscar a identificação dos vírus HSV-1 e/ou 2 utilizando iniciadores multi (MADHAVAN et al., 1999) e específicos para cada um deles (MARKOULATOS et al., 2001) somente nas úlceras , todos os resultados foram negativos, inclusive o das lesões do paciente cuja a amostra salivar foi positiva para a HSV (Figura 8). A decisão de coletar saliva foi formatada pela perspectiva da biologia do vírus em questão e por seus mecanismos de evasão da defesa imunológica postulada por Friedman (2006), considerando que o retorno deste à boca passaria necessariamente pela via neuroepitelial e como este sai do estado de latência em células ganglionares nervosas tenderia naturalmente à fase produtiva e lítica no epitélio (SCULLY, C. 1989; CLEMENTI, 2000; FLEMINGTON, 2001; WEIR, 2001; KNIPE; CLIFFE, 2008) e a sua não presença neste tecido poderia representar sua presença na secreção que banha e

é responsável pela imunidade humoral da cavidade bucal (MANDEL, 1989; NIEUW AMEROGEN; VEERMAN, 2002; SOARES et al., 2004), o que justificou o achado primário no indivíduo estudado isoladamente.

Postula-se pelo observado que, se o portador for imunocompetente e estiver somente em colapso local ou eventual de resistência tecidual, desenvolverá lesões preliminares maculovesiculares nas áreas ceratinizadas e não ceratinizadas, só que estas estão sujeitas a uma ação imunológica mais efetiva antes mesmo do rompimento da vesícula (CERUTTI et al. 2011), e ainda sofrem descarga viral precoce quando rompem este teto vesicular, erosionam e ulceram, o que não ocorre no epitélio ceratinizado, por este propiciar a estes vírus epiteliotrópicos, proteção mecânica contra a ação imunológica celular e humoral (FRIEDMAN, 2006), sendo desta forma, mais fáceis de serem identificados nas lesões de mucosa com este tipo de revestimento epitelial.

As úlceras ocorrentes pós-vesícula, de etiologia herpética, em mucosa com epitélio sem ceratina, podem aumentar o seu tamanho ou não , com eventual coalescimento e tenderão a ser diagnosticadas clinicamente como estomatite aftosa recorrente , não tendo carga viral em seu leito se a coleta do material local for feita tardiamente, possivelmente devido à ação hidrocinética e imunológica salivar (MANDEL, 1989; NIEUW AMEROGEN; VEERMAN, 2002; SOARES et al., 2004). Isto podendo ter ocorrido na maioria dos incluídos na pesquisa, com exceção do caso estudado, positivo para HSV-2 em avaliação molecular, sendo esta identificação justificada pelo fato da coleta de esfregaço da úlcera ter sido feita precocemente, cerca de duas horas após seu surgimento (Tabela 4 e Figura 10).

A presença da bolha, descrita pelo paciente cujo caso foi relatado amiúde, após orientação de auto-exame, justifica ainda mais a possibilidade do HSV ser, em alguns casos, fator etiológico de úlceras de mucosa não-ceratinizada, diagnosticadas como

estomatite aftosa recorrente. Haja vista, a lesão fundamental da EAR ser uma úlcera e não uma vesícula (NEVILLE et al., 2009; REGEZI; SCIUBBA, 2000) , porém, o desenvolvimento desta, em cavidade bucal pode ser imperceptível (podendo representar o prodromo de úlceras com esta etiologia), ocorrendo em ambos epitélios de revestimento de mucosa (FRIEDMAN, 2006) e sendo precocemente rompida, como previamente citado. Isso fora observado clinicamente no paciente em questão, que identificou a bolha em soalho de boca horas antes e quando avaliado já existia a úlcera em seu lugar, de onde o material para exame foi coletado.

A identificação do vírus HSV-2 em úlcera aftosa recorrente em estudo de caso descrito abre a possibilidade da condição poder representar a manifestação recrudescente de uma DST em cavidade bucal, haja vista, a modalidade de transmissão deste vírus se dar predominantemente pelo contato sexual (CLEMENS; FARHAT, 2010).

7. CONCLUSÃO

Este estudo permite concluir que:

- A identificação de HSV- 2 em úlcera de mucosa não-ceratinizada em paciente estudado, indica que há a possibilidade, em alguns casos, de existir relação etiológica deste vírus, em suas infecções recorrentes, com afecções de mucosa bucal não-ceratinizada diagnosticadas como estomatite aftosa recorrente.
- A não identificação viral, na maior parte dos pacientes avaliados, pode ter se dado não só pela ausência do HSV mas também ter resultado da coleta tardia de material biológico da área não-ceratinizada, podendo representar, desta forma, falsos-negativos.
- A análise molecular para fins diagnósticos de etiologia viral nas EAR deve ser feita com a coleta do material em momentos prodrômicos da condição.
- A estomatite aftosa recorrente pode representar uma recidiva de infecção primária sexualmente transmitida à cavidade bucal.
- Há a necessidade de continuidade da pesquisa utilizando uma amostragem maior, com coletas realizadas em fases prodrômicas da EAR, com o fim de quantificar a prevalência de etiologia viral destas úlceras de mucosa não- ceratinizada, por este e outros alphaherpesvirus.

REFERÊNCIAS

BAGG, J.; MANNINGS, A.; MUNRO, J.; WALKER, D.M. Rapid diagnosis of oral herpes simplex or zoster virus infections by immunofluorescence: comparison with Tzanck cell preparations and viral culture. *Br. Dent. J.*167, n. 7, p. 235-238, Oct. 1989.

BARKVOLL, P. & ATTRAMADAL, A. Recurrent herpes labialis in a military brass band. *Scand. J. Dent. Res.*95, n. 3, p. 256-258, June 1987.

BARRETT, A.P.; BUCKLEY, D.J.; GREENBERG, M.L.; EARL, M.J. The value of exfoliative cytology in the diagnosis of oral herpes simplex infection in immunosuppressed patients. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*62, n. 2, p. 175-178, Aug. 1986.

BASSET, C.; HOLTON, J.; O'MAHONY, R.; ROITT, I. Innate immunity and pathogen – host interactions. *Vaccine*. 21 (Suppl 2): 12-23, 2003.

BIREK, C.; GRANDHI, R.; MCNEILL, K.; SINGER, D.; FICARRA, G.; BOWDEN, G. Detection of *Helicobacter pylori* in oral aphthous ulcers. *J Oral Pathol Med.* 28, p.197-203, 1999.

CERUTTI, A.; CHEN, K.; CHORNY, A. Immunoglobulin responses at the mucosal interface. *Annu. Rev. Immunol.*29, 273-293, 2011.

CHATTOPADHYAY, A.; SHETTY, K.V. Recurrent aphthous stomatitis. *Otolaryngol Clin N Am.* 44, p. 79-88, 2011.

CHILDERS, N.K.; GREENLEAF, C.; LI, F.; DASANAYAKE, A.P.; POWELL, W.D.; MICHALEK, S.M.; Effects of age on immunoglobulin A subclass distribution in human parotid saliva. *Oral Microbiol Immunol.* 18: 298-301, 2003.

CHRISTIE, S.N.; MCCAUGHEY, C.; MARLEY, J.J.; COYLE, P.V.; SCOTT, D.A.; LAMEY, P.J. Recrudescent herpes simplex infection mimicking primary herpetic gingivostomatitis *J. Oral Pathol. Med.*27, n. 1, p. 8-10, Jan. 1998.

CLEMENS, S.A.C.; FARHAT, C.K. Soroprevalência de anticorpos contra vírus herpes simples 1-2 no Brasil. *Rev Saúde Pública*, 44 (4): 726-34, 2010.

CLEMENTI, M. Quantitative molecular analysis of virus expression and replication. *J. Clin. Microbiol.* 38, n. 6, p. 2030-2036, June 2000.

COMPILATO, D.; CARROCIO, A.; CALVINO, F.; DI FEDE, G.; CAMPISI, G. Haematological deficiencies in patients with recurrent aphthosis. *JEADV*, 24, p.667-73, Oct. 2009.

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

DALE, B.A.; KRISANAPRAKORNKIT, S. Defensin antimicrobial peptides in the oral cavity. *J Oral Pathol Med.* 30: 321-7, 2001.

DEVINE, D.A. Antimicrobial peptides in defence of the oral and respiratory tracts. *Mol Immunol.* 40: 431-43, 2003.

EISEN, D. The clinical characteristics of intraoral herpes simplex virus infection in 52 immunocompetent patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* . 26(4): 432-7, 1998.

FARNAUD, S.; EVANS, R.W.; Lactoferrin – a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol Immunol.* 40: 395-405, 2003.

FLEMINGTON, E.K. Herpesvirus lytic replication and the cell cycle: arresting new developments *J. Virol.*75, n. 10, p. 4475-4481, May 2001.

FRAIHA, P,M.; BITTENCOURT, P.G.; CELESTINO, L.R. Estomatite aftosa recorrente. Revisão bibliográfica. Rev. Bras. Otorrinolaringol.68, n.4, p.571-578, Agosto 2002.

FRIEDMAN, H.M. Keratin, a dual role in herpes simplex vírus pathogenesis. Journal of clinical virology 35, p.103-105, 2006.

GOMEZ, R.S.; CARNEIRO, M.A.; SOUZA, L.N.; VICTORIA, J.M.; DE AZEVEDO, W.M.; DE MARCO, L.; KALAPOTHAKIS, E. Oral recurrent human herpes virus infection and bone marrow transplantation survival *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*91, n. 5, p. 552-556, May 2001.

GREENBERG, M.S.; BRIGHTMAN, V.J.; SHIP, I.I. Clinical and laboratory differentiation of recurrent intraoral herpes simplex virus infections following fever *J. Dent. Res.* 48, n. 3, p. 385-391, May 1969.

GURANSKA, N.; URBANIAK, B.; LEWKOWICZ, P.; TCHORZEWSKI, H. Recurrent apthtous ulcers: the etiology with special reference to immunological theories. *Pol. Merkuriusz Lek*, vol.8 (44): 113-17, 2000.

HEDNER, E.; VAHLINE, A.; HIRSCH, J.M. Primary herpes simplex virus (type 1) infection delays healing of oral excisional and extraction wounds in the rat. *J Oral Pathol Med.* 19, p. 471-6, 1990.

HERLOFSON, B.B.; BARKVOLL, P. The effect of two toothpaste detergents on the frequency of recurrent aphthous ulcers. *Acta Odontol Scand.* 54, p. 150-3, 1996.

HOMA, F.L.; BROWN, J.C. Capsid assembly and DNA packaging in Herpes Simplex virus. Rev.Med.Virol. 7, p.107-122, 1997.

KNAUP, B.; SCHUNEMANN, S.; WOLFF, M.H. Subclinical reactivation of herpes simplex virus type 1 in the oral cavity. *Oral Microbiol. Immunol.*15, n. 5, p. 281-283, Oct. 2000.

KNIPE, D.M.; CLIFFE, A. Chromatin control of herpes simplex vírus litic and latent infection. Nature reviews Microbiology 6, p. 211-221, march 2008.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K; FAUSTO, N. Robbins e Cotran Patologia: Bases Patológicas da doenças. 7 ed., Rio de Janeiro: Elsevier, p.378-382, 2005.

LAMEY P.J.; LEWIS M.A.O. Viral infection. *A clinical Guide to oral medicine*. 19, n., 1997.

LAZARINI, P.R.; VIANNA,M.F.; ALCANTARA,M.P.A.; SCALIA, R.A.; FILHO, H.H.C. Pesquisa do vírus herpes simples na saliva de pacientes com paralisia facial periférica de Bell. Rev. Bras. Otorrinolaringol. 72, n.1, p.7-11, jan/fev. 2006.

LEWIS, M.A. O.; Herpes simplex virus: an occupational hazard in dentistry. *Int. Dental J.* 54, n., p. 103-111, 2004.

LLORENTE, J.L.; HIDALGO, F.I.; MELON, S.; DE ONA, M.; CARRENO, M.; SUAREZ, C. Detection of herpes simplex virus-1 by nested PCR. An experimental model *Auris Nasus Larynx*25, n. 4, p. 387-392, Dec. 1998.

LOGAN, H.L.; LUTGENDORF S.; HARTWIG A.; BERBERICH S.L. Immune, stress, and mood markers related to recurrent oral herpes outbreaks. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 86, n. 1, p. 48-54, July 1998.

LOOKER, K.J.; GARNETT, G.P.; SCHMID, G.P. An estimate of the global prevalence and incidence of herpes simplex virus type 2 infection. *Bulletin of the World Health Organization*. 86 (10), Oct. 2008.

MADHAVAN, H.N.; PRIYA, K.; ANAND, A.R.; K.L.THERESE. Detection of Herpes simplex virus (HSV) genome using polymerase chain reaction (PCR) in clinical samples. Comparision of PCR with standard laboratory methods for the detection of HSV. Journal of Clinical Virology 14, p. 145-151, Jun.1989.

MANDEL, I.D. The role of saliva in maintaining oral homeostasis. *J Am Dent Assoc.* 119: 298-304, 1989.

MARKOULATOS, P.; GEORGOPOULOU, A.; SIAFAKAS, N.; PLAKOKEFALOS, E.; TZANAKAKI, G.; KREMATINOU J.K. Laboratory diagnosis of common Herpesvirus infections of the central nervous system by a multiplex PCR assay. J.Clin.Microbiol. 39, n.12, p. 4426-4432, Dec. 2001.

MESSADI, D.V.; YOUNAI, F. Aphthous ulcers. *Dermatologic Therapy*, 23, p. 281-290, 2010.

MIZIARA, I.D. Estomatite Aftóide Recidivante. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, vol.61 (5): 1995.

MOGENSEN, T.H. & PALUDAN, S.R. Molecular pathways in virus-induced cytokine production *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*65, n. 1, p. 131-150, March 2001.

MORI,I.; NISHYIAMA,Y. Herpes simplex virus and varicella-zoster virus: why do these human alphaherpesvirus behave so differently from one another? Rev.Med.Virol.15, p.393-406, Sep.2005.

NEVILLE B.W.; DAMM D.D.; ALLEN C.M.; BOUQUOT J.E. *Patologia Oral & Maxilofacial*. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. cap. 7, p. 241-249; 332-337, 2009.

NIEUW AMEROGEN, A.V.; VEERMAN, E.C.I. Salivary glands and saliva-number 2. Saliva- the defender of the oral cavity. *Oral Diseases*. 8:12-22, 2002.

NISENGARD RJ & NEWMAN MG. *Microbiologia oral e Imunologia*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap. 395, 1994.

OAKLEY, C.; EPSTEIN, J.B.; SHERLOCK, C.H. Reactivation of oral herpes simplex virus: implications for clinical management of herpes simplex virus recurrence during radiotherapy. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*84, n. 3, p. 272-278, Sept. 1997.

OZDEMIR, I.Y.; CALKA, O.; KARADAG, A.S.; AKDENIZ, N.; OZTURK, M. Thyroid autoimmunity associated with recurrent aphthous stomatitis. *JEADV*, p. 1-5, 2011.

PEDERSEN, A.; HORNSLETH, A. Recurrent aphthous ulcerations: a possible clinical manifestation of reactivation of varicella zoster or cytomegalovirus infection. *J Oral Pathol Med.* 22(2): 64-68, 1993.

PONTES, I. Desenvolvimento de novos marcadores microssatélites para análise genética em humanos. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução), Universidade Federal de São Carlos – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 57 p., 2003.

PORTER,S.R.; HEGARTY, A.; KALIAKATSOUU,F.; HODGSON, T.A.; SCULLY, C. Recurrent Apthous stomatitis. *Clinics in Dermatology*, Vol.18:569-578, 2000.

- REGEZI, J. A.; SCIUBA, J. J. Patologia Bucal: Correlações clinicopatológicas. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., cap. 1, p. 1-25, 2000.
- RESKE, A.; POLLARA, G.; KRUMMENACHER, C.; CHAIN, B.M.; KATZ, D.R. Understanding HSV-1 entry glycoproteins. *Rev.Med.Virol.*, 17: 205-215, 2007.
- ROBINSON, P.A.; HIGH, A.S.; HUME, W.J. Rapid detection of human herpes simplex virus type 1 in saliva *Arch. Oral Biol.*37, n. 10, p. 797-806, Oct. 1992.
- ROGERS III, R.S. Recurrent Apthous Stomatitis: Clinical characteristics and associated systemic disorders. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, Vol. 16(4): 278-83, 1997.
- ROIZMAN, B. & WHITLEY, R.J. The nine ages of herpes simplex virus *Herpes*.8, n. 1, p. 23-27, Mar. 2001.
- SCOTT, D.A.; COULTER, W.A.; BIAGIONI, P.A.; O'NEILL, H.O.; LAMEY, P.J. Detection of herpes simplex virus type 1 shedding in the oral cavity by polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay at the prodromal stage of recrudescent herpes labialis *J. Oral Pathol. Med.*26, n. 7, p. 305-309, Aug. 1997a.
- SCOTT, D.A.; COULTER, W.A.; LAMEY, P.J. Oral shedding of herpes simplex virus type 1: a review. *J. Oral Pathol. Med.*26, n. 10, p. 441-447, Nov. 1997b.
- SCULLY, C. Orofacial herpes simplex virus infections: current concepts in the epidemiology, pathogenesis, and treatment, and disorders in which the virus may be implicated *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*68, n. 6, p. 701-710, Dec. 1989.
- SCULLY, C.; PORTER, S. Recurrent aphthous stomatitis: current concepts of etiology, pathogenesis and management. *J. Oral Pathol. Med.* 18, p. 21-27, Jan. 1989.
- SCULLY, C.; GORSKY, M.; LOZADA-NUR, F. Apthous ulcerations. *Dermatol. Ther.* Copenhagen, v.15, p.185-205, 2002.
- SCULLY, C.; GORSKY, M.; LOZADA-NUR, F. The diagnosis and management of recurrent apthous estomatitis. *J.Am.Dent. Assoc.* Chicago, v.134, p.200-207, 2003.
- SILVA, L.M.; GUIMARÃES, A.L.S.; VICTÓRIA, J.M.N.; GOMES C.C.; GOMEZ R.S.; Herpes simplex virus type I shedding in the oral cavity of seropositive patients. *Oral Diseases*.11, p. 13-16, 2005.
- SILVA, L.M.; GUIMARÃES, A.L.S.; SANTORO, L.C.; GOMEZ R.S.; The Human Herpes virus-1: a literature review. *Arquivos em Odontologia*.38, n. 3, p. 167-178, Jul/Set 2002.

- SMITH, J.S.; ROBINSON, N.J. Age-specific prevalence of infection whith herpes simplex vírus type 2 and 1: a global review. *J infect Dis.* 186: S3-28, 2002.
- SOARES, R.V.; LIN, T.; SIQUEIRA, C.C.; BRUNO, L.S.; LI, X.; OPPENHEIM, F.G. et al. Salivary micelles: identification of complexes containing MG2, sIgA, lactoferrin, amylase, glycosylated proline –rich protein and lysozyme. *Arch Oral Biol.* 49: 337-43, 2004.
- SONG, B.; LIU, J.J.; YEH, K.C.; KNIPE, D.M. Herpes simplex virus infection blocks events in the G1 phase of the cell cycle *Virology*. 267, n. 2, p. 326-334, Feb. 2000.
- SPRUANCE, S.L. Pathogenesis of herpes simplex labialis: excretion of vírus in the oral cavity. J Clin Microbiol. 19:675-9, 1984.
- STUDD, M.; MACCANCE, D.J.; LEHNER, T. Detection of HSV-1 DNA in patients with Behçet's syndrome and in patients with recurrent oral ulcers by polymerase chain reaction. *J Med Microbiol.* 34, p. 39-43, 1991.
- SUBRAMANYAM, R.V. Ocurrence of recurrent aphthous stomatitis only on lining mucosa and its relationship to smoking A possible hypothesis. *Medical Hypothesis*, 77, p. 185-187, 2011.
- TEN CATE, A.R. Histologia Bucal. Desenvolvimento, Estrutura e Função. 5ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., cap. 15 e 16, p. 296-359, 2001.
- TATEISHI, K.; TOH, Y.; MINAGAWA, H.; TASHIRO, H. Detection of herpes simplex virus (HSV) in the saliva from 1,000 oral surgery outpatients by the Silva, LM polymerase chain reaction (PCR) and virus isolation *J. Oral Pathol. Med.*23, n. 2, p. 80-84, Feb. 1994.
- VARELLA, Rafael B. et al. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo vírus herpes simples (HSV) em pacientes transplantados e não-trasnplantados. *J Bras Patol Med Lab.* V, 41. n.4; p.257-62, 2005.
- XU, F.; STENBERG, M.R.; KOTTIRI, B.J.; McQUILLAN, G.M.; LEE,F.K.; NAHMIAS, A.J. BERMAN,S.M.; MARKOWITZ, L.F. Trend in Herpes simplex virus type 1 and type 2 seroprevalence in the United States. JAMA 296, n.8, p. 964-973, Aug.2006.
- WEIR J.P. Regulation of herpes simplex virus gene expression. *Gene v.* 271, n. 2, p. 117-130, Jun. 2001 .
- WHITLEY R.J.; DAVID W.K.; ROIZMAN B. Herpes simplex viruses. *Clinical Infection Diseases*. 26. p. 541-55, 1998.

WHITLEY, R.J. Herpes simplex virus infection *Semin. Pediatr. Infect. Dis.*13, n. 1, p. 6-11, Jan. 2002.

WOO, S.B. & LEE, S.F. Oral recrudescent herpes simplex virus infection *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*83, n. 2, p. 239-243, Feb. 1997.

WORMSER, G.P.; MACK, L.; LENOX, T. et al. Lack of effect of oral acyclovir on prevention of apthous stomatitis. *Otolaryngology and Head and Neck Surgery*. 98:

APÊNDICES

APÊNDICE I

EQUIPE

| MEMBRO | INSTITUIÇÃO | TITULAÇÃO | FUNÇÃO |
|--|-------------|---------------|----------------|
| | | | |
| Ângela Delfina B. Garrido | UFAM | Doutora | Orientadora |
| Cristina Maria Borborema dos Santos | UFAM | Doutora | Co-orientadora |
| Lioney Nobre Cabral | UEA | Mestre | Pesquisador |
| André Santos da Silva | UFAM | Universitário | Técnico |

APÊNDICE II

Avaliação por análise molecular da presença de vírus herpes simples em lesões diagnosticadas como estomatite aftosa recorrente em cavidade bucal de pacientes imunocompetentes.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, Lioney Nobre Cabral, Professor de Patologia Bucal e Semiologia Odontológica II da UEA, estou avaliando através de Reação em Cadeia de Polimerase a presença de vírus herpes simples tipos 1 e 2 em lesões diagnosticadas como estomatite aftosa recorrente (afta) em cavidade bucal de pacientes saudáveis imunologicamente. Para poder realizar este trabalho preciso examinar e coletar com uma escovinha microbrush devidamente esterilizada, material da úlcera aftosa, descartando a escovinha em seguida e coletar a saliva do indivíduo acometido. Logo em seguida o voluntário será tratado de forma indolor com laserterapia de baixa intensidade ou com creme antiviral em orabase até o desaparecimento da lesão aftosa e de sua sintomatologia e caso encontre em seu exame clínico alguma outra alteração que tenha ou não relação com o objeto do estudo, este será orientado para resolução terapêutica da condição. Caso você concorde em ser examinado e participar do estudo em questão assine abaixo, deixando claro que você só participará deste se quiser, podendo desistir de sua participação a qualquer momento.

Lioney Nobre Cabral, C.D., M.C.

Concordo em ser examinado e ter material de minha boca coletado para participar do trabalho intitulado : "Avaliação por análise molecular da presença de vírus herpes simples em lesões diagnosticadas como estomatite aftosa recorrente em cavidade bucal de pacientes imunocompetentes.".

| Nome: | |
|-------------|--|
| Assinatura: | |

APÊNDICE III

FICHA DE AVALIAÇÃO DO PACIENTE

| NOME: |
|---|
| PROCEDÊNCIA: |
| IDADE: |
| 1. LOCALIZAÇÃO DAS LESÃO (ÕES): |
| ••••••••••••••••••••••••••••••••••••••• |
| 2. FREQUÊNCIA COM QUE OCORRE(M)? |
| 3. FAZ ASSOCIAÇÃO COM ALGUMA SITUAÇÃO ESPECÍFICA? |
| () ESTRESSE () ANSIEDADE (EMOCIONAL, TRABALHO, FÍSICA) () MENSTRUAÇÃO () CALOR OU FRIO INTENSO () DOENÇAS () OUTROS |
| 4. SÍNTOMA OCORRENTE ANTES DO APARECIMENTO DAS ÚLCERAS (PRODROMO) |
| () PRURIDO () PONTADA () ARDÊNCIA () DOR () NÃO NOTADO () NÃO SEI INFORMAR () OUTROS |
| 5. TEMPO DE SURGIMENTO DA LESÃO ? |
| 6. NÚMERO DE ÚLCERAS PRESENTES NO MOMENTO DA CONSULTA: |
| () SOLITÁRIA () DE 2 A 4 ÚLCERAS () MAIS DE 4 |
| 6. TAMANHO DA(S) LESÃO(ÕES) NO MOMENTO DA CONSULTA : |

| 8. | PADRÃO DE DOR NO MOMENTO DA CONSULTA: |
|------|--|
| (|) AUSENTE () LEVE () MODERADA () SEVERA |
| | |
| | |
| DI | ESCRIÇÃO DA(S) LESÃO(ÕES) COMPATÍVEL COM: |
| (|) ESTOMATITE AFTOSA MAIOR |
| (|) ESTOMATITE AFTOSA MENOR |
| (|) ESTOMATITE AFTOSA HERPETIFORME |
| (|) MÁCULA VESICULAR |
| |) VESÍCULA |
| (| OUTRAS OBSERVAÇÕES : |
| •••• | |
| •••• | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| RI | ESPONSÁVEL PELA COLETA : |

APÊNDICE IV: LOCALIZAÇÃO DO FRAGMENTO AMPLIFICADO DE 179 PB PELOS INICIADORES MULTI PARA HSV NO GENOMA DO VÍRUS HSV-1 (MADHAVAN et al., 1999).

LOCUS X14112 152261 bp DNA linear VRL 23-

OCT-2008

DEFINITION Human herpesvirus 1 complete genome. ACCESSION X14112 D00317 D00374 D10879 S40593

VERSION X14112.1 GI:1944536

ORGANISM Human herpesvirus 1

Viruses; dsDNA viruses, no RNA stage; Herpesvirales;

Herpesviridae; Alphaherpesvirinae; Simplexvirus.

(...)
63961 gCACCCggAg GACCTggTCA TCCAgATATC CTgTCTgCTC TACGACCTGT CCACCACCgC
64021 CCTggAgCAC gTCCTCCTGT TTTCGCTCgg TTCCTgCGAC CTCCCCGAAT CCCACCTGAA
64081 CgAgCTggCg gCCAggggCC TgCCCACgCC CgTggTTCTg gAATTCGACA gCGAATTCGA
64141 gATgCTgTTg gCCTTCATGA CCCTTgTGAA ACAGTACGGC CCCGAGTTCG TGACCgggTA
64201 CAACATCATC AACTTCGACT gGCCCTTCTT gCTggCCAAg CTGACGGACA TTTACAAGgT
64261 CCCCCTggAC gggTACggCC gCATGAACgg CCggggCGTg TTTCGCGTGT gggACATAgg
64321 CCAGAGCCAC TTCCAGAAGC gCAGCAAGAT AAAGGTGAAC ggCATGGTGA ACATCGACAT
64381 gTACGgGATT ATAACCGACA AGATCAAGCT CTCGAGCTAC AAGCTCAACG CCGTGGCCGA
64441 AGCCGTCCTG AAGGACAAGA AGAAGGACCT gAGCTATCGC GACATCCCCG CCTACTACGC
64501 CGCCGGGGCCC GCGCAACGCG gggTGATCGG CGAGTACTGC TCGGCCGTCG CGCTCTGCTGT
64561 gggCCAGCTG TTTTTTAAGT TTTTGCCCCA TCTGGAGCTC TCGGCCGTCG CGCGCTTGGC
64621 gggTATTAAC ATCACCCGCA CCATCTACGA CGGCCCAGCAG ATCCGCGTCT TTACGTGCCT
(...)

APÊNDICE V: LOCALIZAÇÃO DO FRAGMENTO AMPLIFICADO DE 179 PB PELOS INICIADORES MULTI PARA HSV NO GENOMA DO VÍRUS HSV-2 (MADHAVAN et al., 1999).

LOCUS NC 001798 154746 bp DNA linear VRL 18-

SEP-2007

DEFINITION Human herpesvirus 2, complete genome.

ACCESSION NC 001798

VERSION NC 001798.1 GI:9629267

ORGANISM Human herpesvirus 2

Viruses; dsDNA viruses, no RNA stage; Herpesvirales; Herpesviridae; Alphaherpesvirinae; Simplexvirus.

(...)

64381 AAGGCCGGGG GGGAGGACGA GCTGGCCTTT CCGGTCGCGG AACGCCCGGA AGACCTCGTC
64441 ATCCAGATCT CCTGTCTGCT CTACGACCTG TCCACCACCG CCCTCGAGCA CATCCTCCTG
64501 TTTTCGCTCG GATCCTGCGA CCTCCCCGAG TCCCACCTCA GCGATCTCGC CTCCAGGGGC
64561 CTGCCGGCCC CCGTCGTCCT GGAGTTTGAC AGCGAATTCG AGATGCTGCT GGCCTTCATG
64621 ACCTTCGTCA AGCAGTACGG CCCCGAGTTC GTGACCAGGT ACAACATCAT CAACTTCGAC
64681 TGGCCCTTCG TCCTGACCAA GCTGACGGAGA ATCTACAAGG TCCCGCTCGA CGGGTACGGG
64741 CGCATGAACG GCCGGGGTT GTTCCGCGTT TGGGACAAC TGTACGGCA CTTTCAGAAG
64801 CGCAGCAAGA TCAAGGTGAA CGGGATGTT GAAGGACAAG
64801 CGCAGCAAGA TCTCCCAGCTA CAAGCTGAAC GCCGTCGCCG AGGCCGTCTT GAAGGACAAG
64921 AAGAAGGATC TGAGCTACCG CGACATCCCC GCCTACTACG CCTCCGGGCC CGCGCAGCGC
64981 GGGGTGATCG GCGAGTATTG TGTGCAGGAC TCGCTGCTGG TCGGGCAGCT GTTCTTCAAG
65041 TTTCTGCCGC ACCTGGAGCT TTCCGCCGTC GCGCCCTGG CGGGCATCAA CATCACCCGC
(...)

Genoma disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/Z86099

APÊNDICE VI: LOCALIZAÇÃO DO FRAGMENTO DE CROMOSSOMO 4 DO GENOMA HUMANO AMPLIFICADO LOGO ABAIXO DOS 400 PARES DE BASE PELOS INICIADORES MULTI PARA HSV (MADHAVAN et al., 1999).

>gi|205361103|gb|AC226119.2| Homo sapiens BAC
clone CH15-135B10 from chromosome 4, complete sequence

| () | | |
|--|--|-------------------------------|
| gi 2053611 | 3725 3735 3745 3755 3765 3775 TGGCTCTCAG CTCCTGCAGC CCATGGCCCA GAGGCTACCC TCACCAGGGC AGGCTCC | |
| gi 2053611 | | |
| gi 2053611 | | |
| gi 2053611 | | |
| gi 2053611 | . | |
| gi 2053611 | . | |
| gi 2053611 | . | |
| | | |
| gi 2053611 | . | |
| gi 2053611 gi 2053611 | 4145 4155 4165 4175 4185 4195 | CGT |
| | 4145 4155 4165 4175 4185 4195 TCTCCTGAGG CCCATCCTGC CCTTATGCTT GTCTTATCCC CAACCAGACA GGCTGCC 4215 4225 4235 4245 4255 GCCACTCGA TGCCCAGCAC CCACCAGCAT AGCCACTGGG AGTTGTTTCC CCAAGCT 4265 4275 4285 4295 4305 4315 GGCCACTGTG TTAAGGGCCA GTCAGAGCTC ATTTGGACAG GAAGGTTTTC TACACAT | CGT |
| gi 2053611 | 4145 4155 4165 4175 4185 4195 TCTCCTGAGG CCCATCCTGC CCTTATGCTT GTCTTATCCC CAACCAGACA GGCTGCC 4265 4275 4285 4295 4305 4315 | CGT GCA TAC |
| gi 2053611 gi 2053611 | 4145 4155 4165 4175 4185 4195 TCTCCTGAGG CCCATCCTGC CCTTATGCTT GTCTTATCCC CAACCAGACA GGCTGCC </td <td>CGT GGA TAC GTGC GTG GTG</td> | CGT GGA TAC GTGC GTG GTG |
| gi 2053611 gi 2053611 gi 2053611 | 4145 4155 4165 4175 4185 4195 TCTCCTGAGG CCCATCCTGC CCTTATGCTT GTCTTATCCC CAACCAGACA GGCTGCC CCACCAGGGC CCACCAGCAT GTCTTATCCC CAACCAGACA 4255 4235 4245 4255 GCCACTCCGA TGCCCAGCAC CCACCAGCAT AGCCACCTGG AGTTGTTTCC CCAAGCT <t< td=""><td>CCGT GGCA TAC CAC </td></t<> | CCGT GGCA TAC CAC |

ANEXOS







UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

IDENTIFICAÇÃO

Proc. nº 123/10-CEP/ESA-UEA — Projeto de Pesquisa "Avaliação por análise molecular da presença de vírus herpes simples em lesões diagnosticadas como estomatite aftosa recorrente em cavidade bucal de pacientes imunocompetentes." Interessado — Dr. Lioney Nobre Cabral

Data de apreciação - 12.11.2010

DECISÃO

Nesta data, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade do Estado do Amazonas, acatando voto do(a) eminente relator(a), **APROVOU** o processo supra identificado, com base no caput do item VII, na alínea a do sub-ítem VII.13 e na alínea a do sub-ítem IX.2 da Resolução CNS 196/96, ficando, portanto, autorizado o início da pesquisa proposta.

Plenário do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Estado do Amazonas, em Manaus, 12 de novembro de 2010.

Prof^a. Dr^a. Valdelize Elvas Pinheiro Coordenadora em exercício do CEP/UEA

ANEXO II

NOTA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS



DECLARAÇÃO

DECLARAMOS para o devidos fins que o aluno de doutorado Prof. Lioney Nobre Cabral e sua orientadora Profa. Dra. Ângela Delfina Bittencourt Garrido ambos do Programa de Pos-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, deram entrada neste órgão, documento datado de 19/07/2011, encaminhando para apreciação, análise e futura elaboração de relatório descritivo, para cumprimento do Pedido de patente, perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI). O resultado da pesquisa tem como título: "Avaliação por análise molecular da presença de virus herpes simples em lesões diagnosticadas como estomatite aftosa recorrente em cavidade bucal de pacientes imunocompetentes"

Manaus, 22 de agosto de 2011

Mª do P. Socorro de Lima Verde Coelho Coord. Operacional NIT - UFAM