



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA INTEGRADA

MARIANA DE MORAES CORRÊA PEREZ

**DETECÇÃO DA PRESENÇA DE CMV POR RT-PCR E AVALIAÇÃO
DE PARÂMETROS CLÍNICOS PERIODONTAIS EM PACIENTES
SUBMETIDOS A HEMODIÁLISE**

RECIFE- PE
2017

VIRTUS IMPAVIDA

MARIANA DE MORAES CORRÊA PEREZ

**DETECÇÃO DA PRESENÇA DE CMV POR RT-PCR E AVALIAÇÃO
DE PARÂMETROS CLÍNICOS PERIODONTAIS EM PACIENTES
SUBMETIDOS A HEMODIÁLISE**

Dissertação apresentada à banca da Pós-Graduação em Clínica Integrada do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de mestre em Clínica Odontológica Integrada.

Orientadora: Prof. Dra. Alessandra de Albuquerque Tavares Carvalho

Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros

Linha de pesquisa: Avaliação clínica e laboratorial em odontologia

RECIFE-PE
2017

P438d Perez, Mariana de Moraes Correa.
Detecção da presença de CMV por RT-PCR e avaliação de parâmetros periodontais em pacientes submetidos a hemodiálise / Mariana de Moraes Correa Perez. – 2017.
43f. ; 30 cm.

Orientadora: Alessandra de Albuquerque Carvalho.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-graduação em Odontologia.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Hemodiálise. 2. Citomegalovírus. 3. Doenças periodontais. 4. Reação em cadeia da polimerase em tempo real. I. Carvalho, Alessandra de Albuquerque (orientadora). II. Título.

617.6 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2018 - 212)

MARIANA DE MORAES CORRÊA PEREZ

Aprovado em 16 de fevereiro de 2017

**“DETECÇÃO DA PRESENÇA DE CMV POR RT-PCR E AVALIAÇÃO DE
PARÂMETROS CLÍNICOS PERIODONTAIS EM PACIENTES SUBMETIDOS A
HEMODIÁLISE”**

Orientadora: Prof. Dra. Alessandra de Albuquerque Tavares Carvalho

Co-orientador: Luiz Alcino Monteiro Gueiros

Banca Examinadora:

3° _____
Prof. Dr. Jair Carneiro Leão (EXAMINADOR INTERNO)
Universidade Federal de Pernambuco

2° _____
Prof. Dr. GUSTAVO PINA GODOY (EXAMINADOR INTERNO)
Universidade Federal de Pernambuco

1° _____
Prof. Dr. GIOVANNI LORENZO LODI (EXAMINADOR EXTERNO)
Universidade de Milão

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo conforto nos dias difíceis, pelo dom da vida e pelas felicidades conquistadas.

Ao meu pai, pelo apoio e carinho incondicional, sempre acreditando nos meus sonhos, e a minha mãe pela alegria que sempre me ensina a ter.

A Felipe Luz, meu noivo, por entender minhas ausências em momentos de estudo e pelas constantes palavras carinhosas que sempre me fizeram acreditar que tudo iria dar certo.

A minha querida orientadora Prof. Alessandra, por se mostrar sempre compreensiva e acreditar no meu trabalho, desde os tempos de graduação. E ao meu co-orientador Prof. Luiz Alcino pela disponibilidade e significantes ensinamentos. Agradeço também a Prof. Jair Carneiro Leão, Ritinha, Camila Carvalho, Marina Maymone e a todos que fazem parte da equipe de Estomatologia da UFPE.

Aos pacientes, enfermeiros e toda equipe médica do departamento de Nefrologia do Hospital das Clínicas da UFPE e do Hospital Maria Lucinda, pela atenção e colaboração durante a fase de coleta. Principalmente a nefrologia Barbara Luz, pelo apoio com os pacientes e pelas respostas as incansáveis dúvidas.

A toda a equipe do laboratório de Entomologia e de Parasitologia do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães. Em especial a Tatiane Romão e Luydson Richardson pelas enormes contribuições durante toda a fase laboratorial desse trabalho e pela paciência em me ensinar sobre uma área que antes era tão abstrata para mim.

A plataforma de sequenciamento da FIOCRUZ-PE pela enorme contribuição laboratorial.

Aos meus colegas da pós-graduação pelas constantes ajudas e aos meus amigos de infância e de faculdade por sempre me incentivarem a seguir meus sonhos.

Aos professores da pós-graduação de Odontologia da UFPE por seus conhecimentos transmitidos.

Sem todo esse apoio nada teria acontecido, MUITO obrigada!

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi detectar a carga viral do citomegalovírus (CMV) e presença de periodontite em pacientes renais crônicos submetidos a hemodiálise. Estudo epidemiológico e observacional, composto por um grupo caso que envolvia pacientes em hemodiálise provenientes do Hospital das Clínicas da UFPE e do Hospital Maria Lucinda. O grupo controle foi composto por pacientes que realizaram primeira consulta para triagem na clínica de Estomatologia da UFPE, sendo saudáveis para doença renal crônica. A detecção do CMV foi feita pela técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real. O diagnóstico periodontal foi estabelecido através da avaliação da profundidade de sondagem, perda de inserção clínica, presença de placa visível e de sangramento a sondagem. Foram avaliados 109 pacientes (Caso: n=54; Controle: n=55) com idade média de $46,5 \pm 12,8$ anos, variando dos 18 aos 78 anos, na qual a maioria (56%) era do sexo feminino. Todos os pacientes do grupo controle foram negativos para CMV, enquanto 29 pacientes do grupo caso (53,9%) apresentaram-se positivos. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos quanto à presença de placa visível ($p=0,249$), grau ($p=0,960$) e extensão ($p=0,763$) da periodontite. Entretanto, o sangramento a sondagem foi significativamente menor ($p<0,001$) nos pacientes do grupo caso. Quando os pacientes em hemodiálise foram subdivididos quanto ao tempo de tratamento (até 12 meses; 1 a 2 anos; mais de 2 anos) também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas quanto ao grau de periodontite ($p=0,060$) e presença de CMV ($p=0,588$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os 2 grupos quanto a presença de periodontite, entretanto, o CMV foi positivo apenas nos pacientes em hemodiálise.

Palavras-chave: Hemodiálise. Citomegalovírus. Doenças Periodontais. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the prevalence of cytomegalovirus (CMV) and periodontitis in chronic renal patients undergoing hemodialysis. The present study was epidemiological and observational, composed of a case group that involved patients on hemodialysis from the UFPE Hospital das Clínicas and Maria Lucinda Hospital, Recife, PE. The control group consisted of patients who first consulted for screening at the Stomatology Clinic of UFPE, and were healthy for chronic kidney disease. The detection of CMV was done by the real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) technique. Periodontal diagnosis was established through evaluation of probing depth, clinical attachment loss, presence of visible plaque and bleeding on probing. A total of 109 patients (Case: n = 54; Control: n = 55) were evaluated, with a mean age of 46.5 ± 12.8 years, ranging from 18 to 78 years, which the majority (56%) were female. All patients in the control group were negative for CMV, while 29 patients in the case group (53.9%) were positive. There was no statistically significant difference between the two groups regarding the presence of visible plaque ($p = 0.249$), grade ($p = 0.960$) and extent ($p = 0.763$) of periodontitis. However, bleeding on probing was significantly lower ($p = 0.000$) in the patients in the case group. When hemodialysis patients were subdivided into treatment time (less than 12 months, 1 to 2 years, more than 2 years), no statistically significant differences were found in the degree of periodontitis ($p = 0.060$) and presence of CMV ($p = 0.588$). There was no statistically significant difference between the two groups regarding the presence of periodontitis, however, CMV was positive only in hemodialysis patients.

Keywords: Hemodialysis. Cytomegalovirus. Periodontal Diseases. Real-Time Polymerase Chain Reaction.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	METODOLOGIA	10
3	OBJETIVOS	13
4	CONCLUSÃO	13
	REFERÊNCIAS.....	14
	APÊNDICE A - ARTIGO (REVISTA JOURNAL OF APPLIED ORAL SCIENCE)..	16
	APÊNDICE B - FICHA CLÍNICA PERIODONTAL	31
	ANEXO A - NORMAS DA REVISTA JOURNAL OF APPLIED ORAL SCIENCE..	34
	ANEXO B - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DA UFPE	42

1 INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) é uma enfermidade grave, com alteração da estrutura dos rins, causando perda lenta, progressiva e irreversível das suas funções. Essa patologia pode derivar de uma ampla gama de doenças, tais como: diabetes, hipertensão e glomerulonefrite⁵. Independentemente da sua etiologia, a DRC pode progredir para um estágio terminal, na qual limitações na capacidade de filtração glomerular causam a uremia, caracterizada pelo acúmulo no sangue de produtos metabólicos que deveriam ser filtrados e excretados pelos rins. Esse acúmulo provoca diversos distúrbios sistêmicas que, se não tratados, levam o paciente a óbito, gerando, assim, a necessidade por terapias substitutivas como a diálise e o transplante renal¹⁶.

Fraqueza, distúrbios na coagulação e no sistema imune são algumas das alterações sistêmicas decorrentes da síndrome urêmica. O comprometimento imunológico é responsável por proporcionar um aumento da susceptibilidade a infecções, uma das mais prevalentes causas de morbidade e mortalidade no paciente renal crônico, necessitando de maior monitoramento para evitar o estabelecimento de qualquer foco infeccioso²².

Uma das infecções oportunistas mais frequentemente encontrada nesta população é decorrente do citomegalovírus (CMV), um β -herpesvírus ubíquo, com uma soroprevalência (IgM e IgG) na população entre 40% e 100%^{19,26}. Pacientes em hemodiálise seriam mais susceptíveis a adquirir esse vírus devido as inúmeras transfusões sanguíneas a que estão sujeitos. Sua inoculação normalmente ocorre na infância de forma assintomática, permanecendo na forma latente na maior parte da vida, e dificilmente compromete a saúde de pacientes saudáveis. Contudo, devido ao imunocomprometimento do paciente renal, é possível que ocorra a replicação viral e o estabelecimento da doença⁹.

Por se tratar de uma terapia desgastante que dificulta as atividades diárias, os pacientes visam se libertar da hemodiálise sendo candidatos a transplante renal^{1,16,26}. A detecção do CMV é imprescindível não só para evitar complicações durante a fase dialítica como, também, para diminuir a chance de insucesso do transplante. O paciente com perfil sorológico negativo ao vírus, ao receber um órgão de um doador positivo, terá maior chance de desenvolver a doença ativa por CMV, que é conhecida por influenciar na diminuição da sobrevida ou rejeição do órgão transplantado³.

Os sinais e sintomas da infecção por CMV não são específicos da doença, por isso não se pode estabelecer um diagnóstico clínico sem o auxílio do diagnóstico laboratorial. Os testes sorológicos, feitos por meio da identificação de anticorpos específicos IgM e IgG anti-CMV (para indicar infecção aguda e crônica, respectivamente), são muito usados para definir

o status sorológico do doador e do receptor antes da cirurgia de transplante. Entretanto, esses testes apresentam limitações, não conseguindo distinguir reinfecção, reativação viral e infecção crônica¹⁹.

Técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) conseguem prever a reativação viral antes mesmo do início dos sintomas, identificando infecções subclínicas. A carga viral informada pelo PCR pode ser correlacionada com o risco de desenvolver a doença, guiando o profissional no monitoramento dos pacientes e na necessidade de estabelecimento precoce da terapia antiviral. É uma técnica cara, mas é rápida, sensível e favorece ao melhor acompanhamento dos pacientes imunossuprimidos^{23,14}.

As infecções sistêmicas, entretanto, não são as únicas a desencadear transtornos significativos a saúde do paciente com DRC. A presença de processos infecciosos na cavidade oral pode complicar o quadro desses pacientes. Um exemplo disso é que muitos estudos discutem uma relação bilateral entre a doença periodontal e a DRC. Como os pacientes em hemodiálise apresentam uma deficiência na imunidade, aumento da susceptibilidade a infecções, e, muitas vezes, são mais negligentes quanto a saúde bucal em detrimento da saúde sistêmica, podem apresentar maior propensão a desenvolver periodontite, sendo um agravo muito prevalente nesse grupo^{7,18}.

A doença periodontal (DP) é uma condição inflamatória multifatorial complexa que resulta, inicialmente, do acúmulo de placa bacteriana na superfície dos dentes. No entanto, é a resposta imunológica do paciente que determina a característica destrutiva da doença. Há um aumento de marcadores pró-inflamatórios, como algumas citocinas e proteína C-reativa, em pacientes periodontalmente comprometidos⁷. Semelhantes marcadores também estão envolvidos no desenvolvimento da DRC. Esse aumento de mediadores inflamatórios poderia, então, causar agravo indireto aos rins, enquanto que a disseminação de periodontopatógenos pela corrente sanguínea até este órgão poderia causar um agravo direto²⁷.

Apesar de muitos estudos correlacionarem o CMV como fator de risco para pacientes transplantado, poucos fazem a relação desse vírus com os pacientes em hemodiálise. Da mesma forma, no ambiente hospitalar, pouca relevância tem sido dada as infecções orais como potenciais modificadoras da situação sistêmica desses pacientes, além disso, os resultados na literatura são conflitantes entre a severidade da periodontite e a influência da DRC. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar os parâmetros clínicos periodontais e a presença do CMV em pacientes em hemodiálise em comparação a um grupo controle, com o intuito de verificar se há maior probabilidade do paciente renal em desenvolver esses quadros infecciosos.

2 METODOLOGIA

Pacientes

Foi realizado um estudo epidemiológico e observacional tipo caso-controle no período de março a novembro de 2016. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco (número de parecer: 1.445.608. Foram considerados 2 grupos: Pacientes em hemodiálise (Caso) e indivíduos sistemicamente saudáveis (Controle).

Inclusão por grupo

Foram incluídos na pesquisa pacientes de ambos os sexos, com idade superior a 18 anos. Foram excluídos os pacientes com menos de 8 dentes, sob terapia de imunossupressão, fumantes, diabéticos, grávidas ou nutrízes e aqueles que tenham feito tratamento periodontal nos últimos 6 meses.

Pacientes do grupo caso foram provenientes do Serviços de Nefrologia do Hospital das Clínicas da UFPE (HC-UFPE) e do Hospital Maria Lucinda, Recife - PE, Brasil. Foram convidados a participar todos os pacientes que se apresentassem em hemodiálise no momento da visita, após avaliação dos critérios de exclusão. O grupo controle apresentou pacientes que se declararam sistemicamente saudáveis que compareceram a clínica de Estomatologia da UFPE para primeira consulta odontológica de avaliação, pareando os grupos em relação ao sexo e idade.

Todos os pacientes foram submetidos a uma avaliação periodontal de todos os dentes, exceto terceiros molares, para avaliação da profundidade de sondagem, sangramento a sondagem, presença de placa visível e perda de inserção clínica, semelhante a Brito, et al. (2012)⁶. Para profundidade de sondagem foram sondados 6 sítios em cada dente (mésio-vestibular, médio-vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual, médio-lingual e disto-lingual), enquanto para sangramento a sondagem e presença de placa visível foram 4 sítios (mesial, distal, vestibular e palatina). O exame clínico foi realizado no próprio ambulatório de nefrologia para o grupo caso e na clínica de Estomatologia para o grupo controle, por apenas um examinador calibrado, com ajuda de espelho clínico plano número 5 (Duflex®) e sonda periodontal milimetrada tipo Universidade Carolina do Norte (Trinity®).

Primeiramente classificou-se a periodontite quanto ao seu grau em: Sem periodontite, leve (profundidade de sondagem de 4mm), moderada (5 ou 6mm) e severa (> ou = 7mm). Depois classificou quanto a sua extensão em: localizada (< ou = a 30% dos dentes afetados) e generalizada (mais de 30%). Foram considerados pacientes com periodontite aqueles com profundidade de sondagem $\geq$ 04 mm em um ou mais sítios examinados, conforme critérios estabelecidos pela AAP (Academia Americana de Periodontologia)². Depois da avaliação

periodontal foi realizada a coleta de 3ml de sangue de cada paciente, que ficaram armazenadas em freezer a -20°C.

Extração do DNA

O DNA foi extraído a partir de sangue total usando o Kit de extração Wizard Genomic DNA Purification (Promega Bio Sciences, LLC. San Luis Obispo, CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante, feito a partir de 300µl do sangue total. O produto final foi avaliado no NanoDrop-2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) para verificação da presença e qualidade do DNA extraído.

Amplificação do gene da CMV polimerase (*pol*)

A sequência gênica correspondente a subunidade catalítica da DNA polimerase (*pol*) presente no genoma do citomegalovírus (*Human herpes vírus 5 strain NANU complete genome*) disponível no *GeneBank*: KU550090.1, foi utilizada como molde para o desenho de dois novos oligonucleotídeos específicos que flanqueiam uma região conservada da CMV *pol* que contempla um trecho de anelamento de primers e probes *TaqMan* desenhados previamente segundo Yun, et al. (2003)³⁰ e expostos na Tabela 1. Para a amplificação da região *pol* foram utilizados os primers: 1- P1F CMV*pol*/clonagem (5'-GCCAGCCTCTATCCTTCCATCATC-3') e P1R CMV*pol*/clonagem (5'-CGCTGTCCGTGTCCCCGTAGATG-3') cujo produto de PCR teve um fragmento de 586pb. As reações de PCR para amplificação dos fragmentos gênicos selecionados foram realizadas em um volume final de 25 µl contendo 0,4 mM de cada dNTP, 1,6 µM de cada primer associado (Tabela 1), 2,5 U de *Platinum Taq DNA Polimerase*® (Invitrogen), tampão contendo 20 mM Tris-HCl pH 8.4 / 50 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂ e 100 ng do DNA molde extraído de uma amostra positiva para CMV. As reações foram conduzidas em um termociclador BIOMETRA® programado para uma etapa de desnaturação a 94°C por 3 min, seguido de 35 ciclos a 94°C por 50 seg, 52°C por 50 seg e 72°C por 120 seg, e uma etapa final de 72°C por 10 min. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,05X (Tris 8.9 mM; ácido bórico 8.9 mM; EDTA 2 mM), corado com brometo de etídeo e visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta. Os fragmentos gênicos amplificados foram excisados do gel e purificados com o kit “*GFX DNA and Gel Band Purification*®” (GE Healthcare), antes da etapa de clonagem.

Quadro 1. Oligonucleotídeos desenhados a partir do genoma do Herpes vírus humano 5 linhagem NANU gb KU550090.1 específicos para o gene da CMV polimerase.

Oligonucleotídeo	Sequência (5' – 3')
------------------	---------------------

PF CMV <i>po</i> /TaqMan	5'- CATGCGCGAGTGTCAAGAC -3'
PR CMV <i>po</i> /TaqMan	5'- ACTTTGAGTGCCATCTGTTCT -3'
Sonda TaqMan	5'-TGCGCCGTATGCTGCTCGACA-3'

P- Primer, F- Forward, R- Reverse

Clonagem e sequenciamento do gene da CMV polimerase (*pol*) em pGEMTeasy

O produto de PCR do gene da CMV polimerase foi excisado e purificado a partir de gel de agarose, o qual foi submetido a uma etapa de tratamento *A-tailed*, cuja reação foi realizada em um volume final de 10ul contendo 5U de *Platinum Taq DNA Polimerase*® (Invitrogen), tampão contendo 20 mM Tris-HCl pH 8.4/ 50 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂ e 0,2mM do desoxinucleotídeo dATP e foi incubada a 70°C em termobloco programado para 30min. O vetor plasmidial de clonagem utilizado foi o pGEM-T Easy® (Promega). A combinação vetor plasmidial/fragmento de PCR foi calculada seguindo as instruções do fabricante e esta foi tratada com T4 DNA ligase® (Promega) a 3U/ul. Após a etapa de ligação, o DNA plasmidial foi utilizado na transformação de bactérias quimiocompetentes (*Escherichia coli* cepa Top10). As colônias foram selecionadas em placas de cultura com ampicilina/IPTG/X-Gal seguindo as instruções do manual técnico do Kit pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems e estas foram inoculadas em 5ml de meio de cultivo Luria-Bertani por 16h a 37°C para a realização de extrações de DNA plasmidial. As mini-preparações plasmidiais foram realizadas através do Kit QIAprep®Spin Miniprep - Plasmid DNA Purification (Qiagen). As preparações de DNA plasmidial foram submetidas à reação de sequenciamento automático no ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), realizada no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do CPqAM, com o intuito de avaliar a identidade e integridade das sequências clonadas. As construções plasmidiais obtidas foram utilizadas como padrão positivo para RT-PCR no diagnóstico de CMV.

Determinação da carga viral do CMV

As construções plasmidiais obtidas na etapa acima foram utilizadas para elaboração da curva padrão para determinação da carga viral absoluta de CMV. Para a curva padrão foram utilizados 5 pontos em diluição seriada partindo de 10⁶ ng/ul. Para a RT-PCR, além dos primers e sondas da tabela 1, foi utilizado o Universal master MIX taqman (Thermo Scientific). A reação teve um volume final de 25 ul, sendo 12,5 ul de master mix, 0,9 ul de primers F e R, 0,625 de sonda taqman, 6 ul H₂O e 5 ul de DNA template. A programação seguiu a ciclagem de 50°C por 2min, 95°C por 10 min seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 seg e 58°C por 1min. A análise de eficiência e cálculo da concentração foi realizada utilizando o software SDS software (thermo scientific).

Análise Estatística

Após a coleta, os dados foram tabulados no Microsoft Excel e analisados no programa SPSS 20.0 para avaliação da análise estatística descritiva. As variáveis contínuas foram comparadas pelo teste não-paramétrico de Mann Whitney para comparar duas categorias e Kruskal Wallis para compara mais de dois grupos. A comparação de proporções foi através do teste da Razão de verossimilhança quando o teste qui-quadrado não fosse possível. Em todos os casos, foram considerados como nível de significância 95% ($p < 0,05$).

3 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a presença de CMV e de periodontite em dois grupos: Pacientes em hemodiálise e nos saudáveis para doença renal crônica.

Objetivos Específicos

- Avaliar a presença da periodontite nos dois grupos estudados por meios dos parâmetros clínicos: Profundidade de sondagem, perda de inserção clínica, sangramento gengival a sondagem e presença de placa visível.
- Inferir se há diferença na severidade da periodontite entre os dois grupos.
- Inferir se há diferença na presença CMV por PCR em tempo real nos dois grupos estudados.
- Inferir se há diferença no valor da carga viral do CMV por PCR em tempo real nos dois grupos estudados.

4 CONCLUSÃO

Concluimos, então, que a Periodontite e o CMV são fatores de risco relevantes para agravamento da DRC, sendo fundamental estabelecer como rotina tanto o monitoramento para detecção da carga viral para CMV (principalmente em pacientes candidatos a transplante), quanto a instrução sobre a importância do cuidado odontológico e o encaminhamento para avaliação e tratamento periodontal. Afinal, como esses pacientes apresentam relativa disfunção imune, é necessária atenção redobrada para minimizar os focos de infecção decorrentes desses problemas, tanto de ordem sistêmica quanto oral.

REFERÊNCIAS

- 1- Abou-El-Yazed E, El-Hoseny IM, Kasim K, El-Sadek AAA, Amar A. Prevalence of cytomegalovirus infection among patients undergoing hemodialysis. Egypt J Immunol. 2008;15(2):33-41.
- 2- American Academy of Periodontology Task Force Report on the Update to the 1999 Classification of Periodontal Diseases and Conditions. J Periodontol. 2015 Jul; 86(7):835-8
- 3- Bal Z, Uyar ME, Tural E, Erdogan E, Colak T, Sezer S, et al. Cytomegalovirus Infection in Renal Transplant Recipients: One Center's Experience. Transplant Proc. 2013;45(10):3520-3
- 4- Bayraktar G, Kurtulus I, Duraduryan A, Cintan S, Kazancioglu R, Yildiz A et al. Dental and periodontal findings in hemodialysis patients. Oral Dis. 2007 Jul; 13(4):393-7.
- 5- Braose APR, Souza CM, Luczyszy SM, Dirschnabel AJ, Claudino M, Olandoski M, et al. Analysis of IL1 gene polymorphisms and transcript levels in periodontal and chronic kidney disease. Cytokine. 2012 Oct; 60(1):76-82.
- 6- Brito F, Almeida S, Figueredo CMS, Bergman S, Suassuna JHR, Fischer RG. Extent and severity of chronic periodontitis in chronic kidney disease patients. J Periodontal Res. 2012 Aug;47(4):426-30.
- 7- Capitanio BL, Hamid MJAA, Dummer CD, Pazinato M. Prevalência de doença periodontal em pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise. Braz J Periodontol - June 2016 - volume 26 - issue 02 - 26(2):14-22.
- 8- Castillo A, Mesa F, Liébana J, García-Martínez O, Ruiz S, García-Valdecasas J. Periodontal and oral microbiological status of an adult population undergoing haemodialysis: A cross-sectional study. Oral Dis. 2007 Mar; 13(2):198-205.
- 9- Castón JJ, Cisneros JM, Torre-Cisneros J. Efectos de la infección viral en el paciente trasplantado. Enferm Infecc Microbiol Clin 2007;25(8):535-48
- 10- Cengiz MI, Sumer P, Cengiz S, Yavuz U. The effect of the duration of the dialysis in hemodialysis patients on dental and periodontal findings. Oral Dis. 2009 Jul;15(5):336-41
- 11- Chen LP, Chiang CK, Peng YS, Hsu SP, Lin CY, Lai CF, et al. Relationship between periodontal disease and mortality in patients treated with maintenance hemodialysis. Am J Kidney Dis. 2011 Feb; 57(2):276-82.
- 12- Chen LP, Hsu SP, Peng YS, Chiang CK, Hung KY. Periodontal disease is associated with metabolic syndrome in hemodialysis patients. Nephrol Dial Transplant. 2011 Dec; 26(12):4068-73.
- 13- Chhokra M, Manocha S, Dodwad V, Gupta U, Vaish S. Establishing and association between renal failure and periodontal health: A cross sectional study. J Clin Diagn Res. 2013 Oct; 7(10):2348-50.
- 14- Enan KA, Rennert H, El-Eragi AM, El Hussein AR, Elkhidir IM. Comparison of real-time PCR to ELISA for the detection of human cytomegalovirus infection in renal transplant patients in the Sudan. Virol J. 2011 May 13;8:222.
- 15- Eshraghi E, Hekmat R. Which CMV viral load threshold be defines as CMV infection in Kidney Transplant Patients. Transplant Proc. 2015 May; 47(4):1136-9

- 16- Guevara HG, Monaco GL, Rivero CS, Vasconcelos V, Souza DP, Raitz R. Manejo odontológico em pacientes com doença renal crônica. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, ano 12, nº 40, abr/jun 2014.
- 17- Huang ST, Lin CL, Yu TM, Wu MJ, Kao CH. Intensive periodontal treatment reduces risk of infection-related hospitalization in hemodialysis population. *Medicine (Baltimore)*. 2015 Aug; 94(34):1436.
- 18- Marakoglu I, GURSOY UK, Demirer S, Sezer H. Periodontal status of chronic renal failure patients receiving hemodialysis. *Yonsei Med J*. 2003 Aug 30;44(4):648-52.
- 19- Matos SB, Meyer R, Lima FWM. Citomegalovírus: Uma revisão da patogenia, epidemiologia e diagnóstico da infecção. *Rev.Saúde.Com* 2011; 7(1): 44-57.
- 20- Pang XL, Fox JD, Fenton JM, Miller GG, Caliendo AM. Interlaboratory comparison of cytomegalovirus viral load assays. *Am J Transplant*. 2009 Feb; 9(2): 258-68.
- 21- Parkar SM, Ajithkrishnan CG. Periodontal status in patients undergoing hemodialysis. *Indian J Nephrol*. 2012 Jul; 22(4):246-50.
- 22- Pliquett RU, Klein C, Grunewald T, Ruf BR, Beige J. Lack of evidence for systemic cytomegalovirus reactivation in maintenance hemodialysis patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2011) 30:1557–1560.
- 23- Ross SA, Novak Z, Pati S, Boppana SB. Diagnosis of cytomegalovirus infection. *Infect Disord Drug Targets*. 2011 Oct; 11(5): 466–474.
- 24- Sekiguchi RT, Pannuti CM, Silva HJ, Medina-Pestana JO, Romito GA. Decrease in oral health may be associated with length of time since beginning dialysis. *Spec Care Dentist*. 2012 Jan-Feb; 32(1):6-10.
- 25- Souza CRD, Libério SA, Guerra RNM, Monteiro S, Silveira EJD, Pereira ALA. Avaliação da condição periodontal de pacientes renais em hemodiálise. *Rev Assoc Med Bras* 2005; 51(5): 285-9.
- 26- Vilibic-Cavlek T, Kolaric B, Ljubin-Sternak S, Kos M, Kaic B, Mlinaric-Galinovic G. Prevalence and dynamics of cytomegalovirus infection among patients undergoing chronic hemodialysis. *Indian J Nephrol*. 2015 Mar-Apr; 25(2):95-8.
- 27- Wahid A, Chaudhry S, Ehsan A, Butt S, Khan AA. Bidirectional relationship between chronic kidney disease & periodontal disease. *Pak J Med Sci*. 2013 Jan; 29(1):211-5
- 28- Yamalik N, Delibasi L, Gulay H, Caglayan F, Haberal M, Caglayan G. The histological investigation of gingiva from patients with chronic renal failure, renal transplants, and periodontitis: a light and electron microscopic study. *J Periodontol* 1991 Dec; 62:737-44.
- 29- Yoshioka M, Shirayama Y, Imoto I, Hinode D, Yanagisawa S, Takeuchi Y. Current status of collaborative relationships between dialysis facilities and dental facilities in Japan: Results of a Nationwide survey. *BMC Nephrol*. 2015 Feb 12; 16:17.
- 30- Yun Z, Lewensohn-Fuchs I, Ljungman P, Ringholm L, Jonsson J, Albert J. A real-time TaqMan PCR for routine quantitation of cytomegalovirus DNA in crude leukocyte lysates from stem cell transplant patients. *J Virol Methods*. 2003 Jun 9;110(1):73-9.

APÊNDICE A - ARTIGO (REVISTA JOURNAL OF APPLIED ORAL SCIENCE)

**DETECÇÃO DA PRESENÇA DE CMV POR PCR EM TEMPO REAL E AVALIAÇÃO DE
PARÂMETROS CLÍNICOS PERIODONTAIS EM PACIENTES SUBMETIDOS A
HEMODIÁLISE**

Detection of CMV presence by real time - PCR and evaluation of periodontal clinical
parameters in patients submitted to hemodialysis

**Mariana de Moraes Corrêa Perez¹; Luiz Alcino Monteiro Gueirros²; Alessandra de
Albuquerque Tavares Carvalho².**

¹Mestranda em Odontologia com área de concentração em Clínica Integrada pela
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

²Professores Adjuntos do curso de graduação em Odontologia da UFPE e membros do
Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFPE.

Endereço para correspondência:

Alessandra de Albuquerque Tavares Carvalho

Av. Professor Moraes Rego, 1235 – Cidade Universitária, Recife-PE

CEP: 50670-901. Email: alessandra.atcarvalho@gmail.com

RESUMO

Objetivo: O objetivo desse trabalho foi detectar a carga viral do citomegalovírus (CMV) e presença de periodontite em pacientes renais crônicos submetidos a hemodiálise. **Materiais e Métodos:** Estudo epidemiológico e observacional, composto por um grupo caso que envolvia pacientes em hemodiálise provenientes do Hospital das Clínicas da UFPE e do Hospital Maria Lucinda. O grupo controle foi composto por pacientes que realizaram primeira consulta para triagem na clínica de Estomatologia da UFPE, sendo saudáveis para doença renal crônica. A detecção do CMV foi feita pela técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real. O diagnóstico periodontal foi estabelecido através da avaliação da profundidade de sondagem, perda de inserção clínica, presença de placa visível e de sangramento a sondagem. **Resultados:** Foram avaliados 109 pacientes (Caso: n=54; Controle: n=55) com idade média de $46,5 \pm 12,8$ anos, variando dos 18 aos 78 anos, na qual a maioria (56%) era do sexo feminino. Todos os pacientes do grupo controle foram negativos para CMV, enquanto 29 pacientes do grupo caso (53,9%) apresentaram-se positivos. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos quanto à presença de placa visível ($p=0,249$), grau ($p=0,960$) e extensão ($p=0,763$) da periodontite. Entretanto, o sangramento a sondagem foi significativamente menor ($p<0,001$) nos pacientes do grupo caso. Quando os pacientes em hemodiálise foram subdivididos quanto ao tempo de tratamento (até 12 meses; 1 a 2 anos; mais de 2 anos) também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas quanto ao grau de periodontite ($p=0,060$) e presença de CMV ($p=0,588$). **Conclusão:** Não houve diferença estatisticamente significativa entre os 2 grupos quanto a presença de periodontite, entretanto, o CMV foi positivo apenas nos pacientes em hemodiálise.

Palavras-chave: Hemodiálise. Citomegalovírus. Doenças Periodontais. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real.

INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) é uma enfermidade grave, com alteração da estrutura dos rins, causando perda lenta, progressiva e irreversível das suas funções. Essa patologia pode derivar de uma ampla gama de doenças, como: diabetes, hipertensão e glomerulonefrite⁵. Independentemente da sua etiologia, a DRC pode progredir para um estágio terminal, na qual limitações na capacidade de filtração glomerular causam a uremia, caracterizada pelo acúmulo no sangue de produtos metabólicos que deveriam ser filtrados e excretados pelos rins. Esse acúmulo provoca diversos distúrbios sistêmicos que, se não tratados, levam o paciente a óbito, gerando, assim, a necessidade por terapias substitutivas como a diálise e o transplante renal¹⁶.

Fraqueza, distúrbios na coagulação e no sistema imune são algumas das alterações sistêmicas decorrentes da síndrome urêmica. O comprometimento imunológico é responsável por proporcionar um aumento da susceptibilidade a infecções, uma das mais prevalentes causas de morbidade e mortalidade no paciente renal crônico, necessitando de maior monitoramento para evitar o estabelecimento de qualquer foco infeccioso²².

Uma das infecções oportunistas mais frequentemente encontrada nesta população é decorrente do citomegalovírus (CMV), um β -herpesvírus ubíquo, com uma soroprevalência na população entre 40% e 100%^{19,26}. Pacientes em hemodiálise seriam mais susceptíveis a adquirir esse vírus devido as inúmeras transfusões sanguíneas a que estão sujeitos. Sua inoculação normalmente ocorre na infância de forma assintomática, permanecendo na forma latente na maior parte da vida, e dificilmente compromete a saúde de pacientes saudáveis. Contudo, devido ao imunocomprometimento do paciente renal, é possível que ocorra a replicação viral e o estabelecimento da doença⁹.

Por se tratar de uma terapia desgastante que dificulta as atividades diárias, os pacientes visam se libertar da hemodiálise sendo candidatos a transplante renal^{1,16,26}. A detecção do CMV é imprescindível não só para evitar complicações durante a fase dialítica como, também, para diminuir a chance de insucesso do transplante. O paciente com perfil sorológico negativo ao vírus, ao receber um órgão de um doador positivo, terá maior chance de desenvolver a doença ativa por CMV, que é conhecida por influenciar na diminuição da sobrevida ou rejeição do órgão transplantado³.

Os sinais e sintomas da infecção por CMV não são específicos da doença, por isso não se pode estabelecer um diagnóstico clínico sem o auxílio do diagnóstico laboratorial. Os testes sorológicos, feitos por meio da identificação de anticorpos específicos IgM e IgG anti-CMV (para indicar infecção aguda e crônica, respectivamente), são muito usados para definir o status sorológico do doador e do receptor antes da cirurgia de transplante. Entretanto, esses testes apresentam limitações, não conseguindo distinguir reinfecção, reativação viral e infecção crônica¹⁹.

Técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) conseguem prever a reativação viral antes mesmo do início dos sintomas, identificando infecções subclínicas. A carga viral informada pelo PCR pode ser correlacionada com o risco de desenvolver a doença, guiando o profissional no monitoramento dos pacientes e na necessidade de estabelecimento precoce da terapia antiviral. É uma técnica cara, mas é rápida, sensível e favorece ao melhor acompanhamento dos pacientes imunossuprimidos^{23,14}.

As infecções sistêmicas, entretanto, não são as únicas a desencadear transtornos significativos a saúde do paciente com DRC. A presença de processos infecciosos na cavidade oral pode complicar o quadro desses pacientes. Um exemplo disso é que muitos estudos discutem uma relação bilateral entre a doença periodontal e a DRC. Como os pacientes em hemodiálise apresentam uma deficiência na imunidade, aumento da susceptibilidade a infecções, e, muitas vezes, são mais negligentes quanto a saúde bucal em detrimento da saúde sistêmica, podem apresentar maior propensão a desenvolver periodontite, sendo um agravo muito prevalente nesse grupo^{7,18}.

A doença periodontal (DP) é uma condição inflamatória multifatorial complexa que resulta, inicialmente, do acúmulo de placa bacteriana na superfície dos dentes. No entanto, é a resposta imunológica do paciente que determina a característica destrutiva da doença. Há um aumento de marcadores pró-inflamatórios, como algumas citocinas e proteína C-reativa, em pacientes periodontalmente comprometidos⁷. Semelhantes marcadores também estão envolvidos no desenvolvimento da DRC. Esse aumento de mediadores inflamatórios poderia, então, causar agravo indireto aos rins, enquanto que a disseminação de periodontopatógenos pela corrente sanguínea até este órgão poderia causar um agravo direto²⁷.

Apesar de muitos estudos correlacionarem o CMV como fator de risco para pacientes transplantado, poucos fazem a relação desse vírus com os pacientes em hemodiálise. Da mesma forma, no ambiente hospitalar, pouca relevância tem sido dada as infecções orais como potenciais modificadoras da situação sistêmica desses pacientes, além disso, os resultados na literatura são conflitantes entre a severidade da periodontite e a influência da DRC. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar os parâmetros clínicos periodontais e a presença do CMV em pacientes em hemodiálise em comparação a um grupo controle, com o intuito de verificar se há maior probabilidade do paciente renal em desenvolver esses quadros infecciosos.

METODOLOGIA

Pacientes

Foi realizado um estudo epidemiológico e observacional tipo caso-controle no período de março a novembro de 2016. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da

Universidade Federal de Pernambuco (número de parecer: 1.445.608. Foram considerados 2 grupos: Pacientes em hemodiálise (Caso) e indivíduos sistemicamente saudáveis (Controle).

Inclusão por grupo

Foram incluídos na pesquisa pacientes de ambos os sexos, com idade superior a 18 anos. Foram excluídos os pacientes com menos de 8 dentes, sob terapia de imunossupressão, fumantes, diabéticos, grávidas ou nutrízes e aqueles que tenham feito tratamento periodontal nos últimos 6 meses.

Pacientes do grupo caso foram provenientes do Serviços de Nefrologia do Hospital das Clínicas da UFPE (HC-UFPE) e do Hospital Maria Lucinda, Recife - PE, Brasil. Foram convidados a participar todos os pacientes que se apresentassem em hemodiálise no momento da visita, após avaliação dos critérios de exclusão. O grupo controle apresentou pacientes que se declararam sistemicamente saudáveis que compareceram a clínica de Estomatologia da UFPE para primeira consulta odontológica de avaliação, pareando os grupos em relação ao sexo e idade.

Todos os pacientes foram submetidos a uma avaliação periodontal de todos os dentes, exceto terceiros molares, para avaliação da profundidade de sondagem, sangramento a sondagem, presença de placa visível e perda de inserção clínica, semelhante a Brito, et al. (2012)⁶. Para profundidade de sondagem foram sondados 6 sítios em cada dente (mésio-vestibular, médio-vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual, médio-lingual e disto-lingual), enquanto para sangramento a sondagem e presença de placa visível foram 4 sítios (mesial, distal, vestibular e palatina). O exame clínico foi realizado no próprio ambulatório de nefrologia para o grupo caso e na clínica de Estomatologia para o grupo controle, por apenas um examinador calibrado, com ajuda de espelho clínico plano número 5 (Duflex®) e sonda periodontal milimetrada tipo Universidade Carolina do Norte (Trinity®).

Primeiramente classificou-se a periodontite quanto ao seu grau em: Sem periodontite, leve (profundidade de sondagem de 4mm), moderada (5 ou 6mm) e severa (> ou = 7mm). Depois classificou quanto a sua extensão em: localizada (< ou = a 30% dos dentes afetados) e generalizada (mais de 30%). Foram considerados pacientes com periodontite aqueles com profundidade de sondagem $\geq$ 04 mm em um ou mais sítios examinados, conforme critérios estabelecidos pela AAP (Academia Americana de Periodontologia)². Depois da avaliação periodontal foi realizada a coleta de 3ml de sangue de cada paciente, que ficaram armazenadas em freezer a -20°C.

Extração do DNA

O DNA foi extraído a partir de sangue total usando o Kit de extração Wizard Genomic DNA Purification (Promega Bio Sciences, LLC. San Luis Obispo, CA, USA) de acordo com as

recomendações do fabricante, feito a partir de 300µl do sangue total. O produto final foi avaliado no NanoDrop-2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) para verificação da presença e qualidade do DNA extraído.

Amplificação do gene da CMV polimerase (*pol*)

A sequência gênica correspondente a subunidade catalítica da DNA polimerase (*pol*) presente no genoma do citomegalovírus (*Human herpes vírus 5 strain NANU complete genome*) disponível no *GeneBank*: KU550090.1, foi utilizada como molde para o desenho de dois novos oligonucleotídeos específicos que flanqueiam uma região conservada da CMV *pol* que contempla um trecho de anelamento de primers e probes *TaqMan* desenhados previamente segundo Yun, et al. (2003)³⁰ e expostos na Tabela 1. Para a amplificação da região *pol* foram utilizados os primers: 1- P1F CMV*pol*clonagem (5'-GCCAGCCTCTATCCTTCCATCATC-3') e P1R CMV*pol*clonagem (5'-CGCTGTCCGTGTCCCCGTAGATG-3') cujo produto de PCR teve um fragmento de 586pb. As reações de PCR para amplificação dos fragmentos gênicos selecionados foram realizadas em um volume final de 25 µl contendo 0,4 mM de cada dNTP, 1,6 µM de cada primer associado (Tabela 1), 2,5 U de *Platinum Taq DNA Polimerase*® (Invitrogen), tampão contendo 20 mM Tris-HCl pH 8.4 / 50 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂ e 100 ng do DNA molde extraído de uma amostra positiva para CMV. As reações foram conduzidas em um termociclador BIOMETRA® programado para uma etapa de desnaturação a 94°C por 3 min, seguido de 35 ciclos a 94°C por 50 seg, 52°C por 50 seg e 72°C por 120 seg, e uma etapa final de 72°C por 10 min. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,05X (Tris 8.9 mM; ácido bórico 8.9 mM; EDTA 2 mM), corado com brometo de etídeo e visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta. Os fragmentos gênicos amplificados foram excisados do gel e purificados com o kit “*GFX DNA and Gel Band Purification*®” (GE Healthcare), antes da etapa de clonagem.

Quadro 1. Oligonucleotídeos desenhados a partir do genoma do Herpes vírus humano 5 linhagem NANU gb KU550090.1 específicos para o gene da CMV polimerase.

Oligonucleotídeo	Sequência (5' – 3')
PF CMV <i>pol</i> /TaqMan	5'- CATGCGCGAGTGTCAAGAC -3'
PR CMV <i>pol</i> /TaqMan	5'- ACTTTGAGTGCCATCTGTTTCCT -3'
Sonda TaqMan	5'-TGCGCCGTATGCTGCTCGACA-3'

P- Primer, F- Forward, R- Reverse

Clonagem e sequenciamento do gene da CMV polimerase (*pol*) em pGEMTeasy

O produto de PCR do gene da CMV polimerase foi excisado e purificado a partir de gel de agarose, o qual foi submetido a uma etapa de tratamento *A-tailed*, cuja reação foi realizada em um volume final de 10ul contendo 5U de *Platinum Taq DNA Polimerase*® (Invitrogen), tampão contendo 20 mM Tris-HCl pH 8.4/ 50 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂ e 0,2mM do desoxinucleotídeo dATP e foi incubada a 70°C em termobloco programado para 30min. O vetor plasmidial de clonagem utilizado foi o pGEM-T Easy® (Promega). A combinação vetor plasmidial/fragmento de PCR foi calculada seguindo as instruções do fabricante e esta foi tratada com T4 DNA ligase® (Promega) a 3U/ul. Após a etapa de ligação, o DNA plasmidial foi utilizado na transformação de bactérias quimiocompetentes (*Escherichia coli* cepa Top10). As colônias foram selecionadas em placas de cultura com ampicilina/IPTG/X-Gal seguindo as instruções do manual técnico do Kit pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems e estas foram inoculadas em 5ml de meio de cultivo Luria-Bertani por 16h a 37°C para a realização de extrações de DNA plasmidial. As mini-preparações plasmidiais foram realizadas através do Kit QIAprep®Spin Miniprep - Plasmid DNA Purification (Qiagen). As preparações de DNA plasmidial foram submetidas à reação de sequenciamento automático no ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), realizada no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do CPqAM, com o intuito de avaliar a identidade e integridade das sequências clonadas. As construções plasmidiais obtidas foram utilizadas como padrão positivo para RT-PCR no diagnóstico de CMV.

Determinação da carga viral do CMV

As construções plasmidiais obtidas na etapa acima foram utilizadas para elaboração da curva padrão para determinação da carga viral absoluta de CMV. Para a curva padrão foram utilizados 5 pontos em diluição seriada partindo de 10⁶ ng/ul. Para a RT-PCR, além dos primers e sondas da tabela 1, foi utilizado o Universal master MIX taqman (Thermo Scientific). A reação teve um volume final de 25 ul, sendo 12,5 ul de master mix, 0,9 ul de primers F e R, 0,625 de sonda taqman, 6 ul H₂O e 5 ul de DNA template. A programação seguiu a ciclagem de 50°C por 2min, 95°C por 10 min seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 seg e 58°C por 1min. A análise de eficiência e cálculo da concentração foi realizada utilizando o software SDS software (thermo scientific).

Análise Estatística

Após a coleta, os dados foram tabulados no Microsoft Excel e analisados no programa SPSS 20.0 para avaliação da análise estatística descritiva. As variáveis contínuas foram comparadas pelo teste não-paramétrico de Mann Whitney para comparar duas categorias e Kruskal Wallis para compara mais de dois grupos. A comparação de proporções foi através

do teste da Razão de verossimilhança quando o teste qui-quadrado não fosse possível. Em todos os casos, foram considerados como nível de significância 95% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Foram avaliados 109 pacientes, sendo 54 do grupo caso (Hemodiálise) e 55 do grupo controle. A maioria dos pacientes era do sexo feminino (56%), com idade média de $46,5 \pm 12,8$ anos, variando dos 18 aos 78 anos. Houve maior predomínio de indivíduos com baixa escolaridade em ambos os grupos, no qual, 57,9% cursaram apenas até o ensino fundamental.

Em relação a presença do CMV, nenhum paciente do grupo controle teve resultado positivo, enquanto no grupo caso 29 (53,7%) foram positivos. A carga viral variou de 214.250 a 396.821 cópias/mL, com valor médio de 265.282 cópias/mL. Essas cargas foram consideradas baixas de acordo com a faixa de detecção estabelecida para o CMV durante a PCR, que variou de 24 mil a 1 milhão de cópias/ml. Os resultados da carga viral foram condizentes com a ausência de infecção ativa por CMV, tanto sistêmica quanto oral, nos pacientes avaliados.

Ao correlacionar a presença do CMV no grupo caso com as variáveis: Idade ($p = 0,425$), tempo de hemodiálise ($p = 0,620$), grau ($p = 0,181$) e a extensão ($p = 0,127$) da periodontite, nenhum resultado estatisticamente significativo foi encontrado. Nem mesmo quando subdividimos esses pacientes quanto ao tempo de hemodiálise (até 1 ano; 1 a 2 anos e mais de 3 anos), nenhuma diferença significativa foi encontrada quanto a presença do CMV, como é visto na tabela 1.

Já quando a periodontite foi avaliada, comparando os dois grupos em relação ao seu grau ($p = 0,960$) e extensão ($p = 0,763$), nenhuma diferença foi encontrada. Ambos os grupos tiveram alta prevalência desse agravo. Apenas 10 pacientes do grupo caso (18,5%) não apresentaram periodontite, contra 9 do grupo controle (16,36%), como mostra a tabela 2. A periodontite severa generalizada foi a forma mais presente tanto nos pacientes em hemodiálise (37%) quanto nos controles (38,18%).

A escolaridade teve correlação significativa com o grau da periodontite tanto no grupo caso ($p = 0,024$) quanto no grupo controle ($p = 0,012$), no qual pacientes com baixa escolaridade tiveram maiores chances de desenvolver periodontite severa. Já ao correlacionar a idade com o grau de periodontite, quanto mais velho o paciente, maior a chance de desenvolver periodontite, tanto nos pacientes em hemodiálise ($p < 0,001$) quanto nos saudáveis ($p = 0,002$), como mostra a tabela 3.

A média da porcentagem de faces com sangramento foi menor no grupo caso (12,7%) do que no controle (21,4%) com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$). Já em

relação a média das faces com presença de placa visível os resultados foram bastante semelhantes entre grupo caso (12,2%) e controle (12,6%), como mostra a tabela 4.

DISCUSSÃO

Infecções por CMV já são bem conhecidas por provocar graves alterações como febre alta, renitite, colite e neuropatia em pacientes imunossuprimidos, transplantados e HIV positivo, entretanto, pouco tem se falado da sua importância para os pacientes renais crônicos submetidos a hemodiálise. Esses pacientes não costumam ser monitorados para esse tipo de infecção, mesmo após alguns estudos relatarem que a síndrome urêmica está associada com uma disfunção imune, incluindo defeitos nas funções de linfócitos e monócitos, de modo que um paciente em diálise pode estar com algum grau de imunossupressão, resultando em altas taxas de morbidade e mortalidade por complicações infecciosas¹.

Além disso, pacientes em hemodiálise costumam estar na fila para transplante, necessitando da eliminação de qualquer foco infeccioso. Todavia, as infecções sistêmicas não são as únicas a agravar o estado de saúde do paciente em diálise. A periodontite é uma infecção oral inicialmente desenvolvida pelo acúmulo de placa bacteriana na superfície dentária. No entanto, a resposta imunoinflamatória fragilizada desses pacientes poderia propiciar o agravamento e maior predisposição desses pacientes a DP, com possível disseminação sistêmica, que pode comprometer ainda mais a saúde desses pacientes¹³.

Nesse estudo, quanto ao sangramento gengival, apesar de não termos visto diferença entre a quantidade de placa bacteriana nos 2 grupos, os pacientes em hemodiálise tiveram sangramento a sondagem significativamente menor. A inflamação gengival em pacientes renais crônicos é uma relação bem controversa na literatura. Souza, et al.²⁵ (2005) e Yamalik, et al.²⁸ (1991) relataram que o menor sangramento encontrado nesse grupo pode ser decorrente do estado urêmico e sua imunossupressão, que poderiam diminuir a resposta gengival frente a placa bacteriana.

Não foi encontrada diferença entre a presença de periodontite entre os grupos caso e controle. Os resultados obtidos foram semelhantes aos relatados nos estudos de Bayraktar, et al.⁴ (2007), Castillo, et al.⁸ (2007) e Matos, et al.¹⁹ (2011), sugerindo que talvez a DRC não tenha correlação direta com o agravamento da DP. Entretanto, nos trabalhos de Parkar, et al.²¹ (2012), Chhokra, et al.¹³ (2013) e Cengiz, et al.¹⁰ (2009) houve uma piora dos parâmetros clínicos periodontais dos pacientes em hemodiálise em comparação com um grupo controle. Para Parkar, et al.²¹ (2012) a maior prevalência de periodontite em pacientes dialíticos pode estar relacionada a negligência com a higiene bucal, pois esses pacientes costumam apresentar baixa autoestima e grande estresse psicológico, devido as desgastantes e constantes sessões de hemodiálise a que são submetidos. Isso dificultaria a procura por

tratamentos odontológicos, que acabam sendo vistos como de menor prioridade em detrimento da sua condição sistêmica.

Um fator que pode ter influenciado na maior predisposição de Periodontite entre os pacientes controles é que todos eles fizeram busca ativa ao Departamento de Odontologia, pois, provavelmente, estavam com algum incomodo em relação a sua condição bucal. Já os pacientes em hemodiálise foram todos convidados a participar enquanto estavam nas suas sessões de hemodiálise. Outro fator a se considerar para a alta prevalência da DP, em ambos os grupos, é que mais da metade dos pacientes (57,9%) só concluíram, no máximo, até o ensino fundamental. O nível educacional é uma variável demográfica importante que tem sido associada com hábitos de higiene oral mais precários, pois muitos deles podem não ter acesso a orientações básicas sobre esses cuidados²⁴. Repaldando os dados que obtidos, no qual a escolaridade foi maior, tanto no grupo caso quanto no controle, para os pacientes sem periodontite.

O fato da periodontite severa generalizada ter sido a mais predominante causa preocupação, pois ela pode estar relacionada ao aumento local e sistêmico de mediadores de fase aguda, que também estão presentes na progressão da DRC⁷. Sendo assim, quanto mais sítios ativos da doença maior o risco de infecção sistêmica, com possível agravamento da saúde dos pacientes em hemodiálise¹². Alguns estudos, como Chen, et al.¹¹ (2011) e Yoshioka, et al.²⁹ (2015) tem relatado que a periodontite severa tem associação com mortalidade, por várias causas, em pacientes em hemodiálise. Já Huang, et al.¹⁷ (2015) relataram que a melhora do periodonto, após o tratamento periodontal, diminui significativamente a chance de desenvolvimento de infecções sistêmicas graves, como endocardite, pneumonia e osteomielite, pois o tratamento periodontal diminui os mediadores de fase aguda.

Enquanto a periodontite está surgindo atualmente como um fator de risco não tradicional para DRC, o citomegalovírus (CMV), há muito tempo, é considerado a infecção viral oportunista mais comum e que mais causa morbidade, perda de enxerto e mortalidade em renais crônicos.

O estudo de Bal, et al.³ (2013), que avaliou a influência do CMV em transplantados renais, relatou a maior presença desse vírus nos pacientes transplantados que se submeteram a hemodiálise por mais tempo, além disso, a frequência de rejeição aguda foi significativamente maior no grupo CMV positivo. Dentre todos os pacientes avaliados pelo estudo acima, apenas 10,4% dos pacientes apresentaram carga viral positiva, que foi considerada uma baixa taxa de prevalência do vírus. Os autores associaram esse bom resultado a avaliação dos pacientes antes do transplante, no qual, pacientes em hemodiálise que tinham carga negativa para CMV receberam, preferencialmente, o rim com carga viral também negativa e para os que tivessem carga positiva foi estabelecida uma estratégia de

profilaxia antiviral. Isso mostra a importância do monitoramento dos pacientes em hemodiálise para a presença do vírus.

Abou-El-Yazed, et al.¹ (2008), ao avaliar a prevalência do CMV em pacientes em hemodiálise pelas técnicas de soroprevalência (IgG e IgM) e de RT-PCR, relatou baixo índice de concordância entre elas. Enquanto para PCR 30% dos pacientes apresentaram carga positiva para CMV, a soroprevalência para IgG foi de 98% e para IgM de 11%, sendo a PCR considerada uma técnica mais precisa. Entretanto, não foram relatados os valores dessas cargas virais e se elas estão de acordo com a situação clínica do paciente.

Diferentemente dos resultados encontrados no nosso trabalho, Pliquett, et al.²² (2011), ao avaliar a prevalência de CMV em pacientes em hemodiálise por RT-PCR, não encontrou nenhum paciente com carga viral positiva. A comparação entre os diferentes resultados obtidos na literatura para o RT-PCR é bastante difícil, já que não existe uma padronização na preparação dos testes e na detecção da carga viral do CMV entre os laboratórios. Em um estudo comparativo entre laboratórios da Europa, Estados Unidos e Canadá a carga do CMV variou de 100 a 100.000 cópias/mL entre laboratórios¹⁹. Isso não significa erro dos laboratórios. A diferença é decorrente da: Elaboração do teste, limite de detecção e intervalo linear, favorecendo a ampla variedade de valores decorrentes de cada ensaio.

É preciso que o clínico conheça os padrões de detecção do laboratório, para assim, conseguir basear qual intervalo de carga viral seria condizente com o início da terapia antiviral com uso, por exemplo, do aciclovir. Eshraghi, et al.²⁰ (2015) ao tentar avaliar qual a possível carga viral estabeleceria a doença clínica por CMV em transplantados renais, relatou uma média de 3.651.800 cópias/mL entre os pacientes sintomáticos e de 432.590 cópias/mL entre os assintomáticos. Em nosso estudo, obtivemos uma média de 265.282 cópias/mL, que foi considerada baixa, com chances relativamente reduzidas de desenvolver a doença por CMV, o que concordou com a ausência de doença clínica.

Concluimos, então, que a Periodontite e o CMV são fatores de risco relevantes para agravamento da DRC, sendo fundamental estabelecer como rotina tanto o monitoramento para detecção da carga viral para CMV (principalmente em pacientes candidatos a transplante), quanto a instrução sobre a importância do cuidado odontológico e o encaminhamento para avaliação e tratamento periodontal. Afinal, como esses pacientes apresentam relativa disfunção imune, é necessária atenção redobrada para minimizar os focos de infecção decorrentes desses problemas, tanto de ordem sistêmica quanto oral.

REFERÊNCIAS

- 1- Abou-El-Yazed E, El-Hoseny IM, Kasim K, El-Sadek AAA, Amar A. Prevalence of cytomegalovirus infection among patients undergoing hemodialysis. Egypt J Immunol. 2008;15(2):33-41.
- 2- American Academy of Periodontology Task Force Report on the Update to the 1999 Classification of Periodontal Diseases and Conditions. J Periodontol. 2015 Jul; 86(7):835-8
- 3- Bal Z, Uyar ME, Tural E, Erdogan E, Colak T, Sezer S, et al. Cytomegalovirus Infection in Renal Transplant Recipients: One Center's Experience. Transplant Proc. 2013;45(10):3520-3
- 4- Bayraktar G, Kurtulus I, Duraduryan A, Cintan S, Kazancioglu R, Yildiz A et al. Dental and periodontal findings in hemodialysis patients. Oral Dis. 2007 Jul; 13(4):393-7.
- 5- Braose APR, Souza CM, Luczysys SM, Dirschnabel AJ, Claudino M, Olandoski M, et al. Analysis of IL1 gene polymorphisms and transcript levels in periodontal and chronic kidney disease. Cytokine. 2012 Oct; 60(1):76-82.
- 6- Brito F, Almeida S, Figueredo CMS, Bergman S, Suassuna JHR, Fischer RG. Extent and severity of chronic periodontitis in chronic kidney disease patients. J Periodontal Res. 2012 Aug;47(4):426-30.
- 7- Capitanio BL, Hamid MJAA, Dummer CD, Pazinato M. Prevalência de doença periodontal em pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise. Braz J Periodontol - June 2016 - volume 26 - issue 02 - 26(2):14-22.
- 8- Castillo A, Mesa F, Liébana J, García-Martínez O, Ruiz S, García-Valdecasas J. Periodontal and oral microbiological status of an adult population undergoing haemodialysis: A cross-sectional study. Oral Dis. 2007 Mar; 13(2):198-205.
- 9- Castón JJ, Cisneros JM, Torre-Cisneros J. Efectos de la infección viral en el paciente trasplantado. Enferm Infecc Microbiol Clin 2007;25(8):535-48
- 10- Cengiz MI, Sumer P, Cengiz S, Yavuz U. The effect of the duration of the dialysis in hemodialysis patients on dental and periodontal findings. Oral Dis. 2009 Jul;15(5):336-41
- 11- Chen LP, Chiang CK, Peng YS, Hsu SP, Lin CY, Lai CF, et al. Relationship between periodontal disease and mortality in patients treated with maintenance hemodialysis. Am J Kidney Dis. 2011 Feb; 57(2):276-82.
- 12- Chen LP, Hsu SP, Peng YS, Chiang CK, Hung KY. Periodontal disease is associated with metabolic syndrome in hemodialysis patients. Nephrol Dial Transplant. 2011 Dec; 26(12):4068-73.
- 13- Chhokra M, Manocha S, Dodwad V, Gupta U, Vaish S. Establishing and association between renal failure and periodontal health: A cross sectional study. J Clin Diagn Res. 2013 Oct; 7(10):2348-50.
- 14- Enan KA, Rennert H, El-Eragi AM, El Hussein AR, Elkhidir IM. Comparison of real-time PCR to ELISA for the detection of human cytomegalovirus infection in renal transplant patients in the Sudan. Virol J. 2011 May 13;8:222.
- 15- Eshraghi E, Hekmat R. Which CMV viral load threshold be defines as CMV infection in Kidney Transplant Patients. Transplant Proc. 2015 May; 47(4):1136-9

- 16- Guevara HG, Monaco GL, Rivero CS, Vasconcelos V, Souza DP, Raitz R. Manejo odontológico em pacientes com doença renal crônica. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, ano 12, nº 40, abr/jun 2014.
- 17- Huang ST, Lin CL, Yu TM, Wu MJ, Kao CH. Intensive periodontal treatment reduces risk of infection-related hospitalization in hemodialysis population. *Medicine (Baltimore)*. 2015 Aug; 94(34):1436.
- 18- Marakoglu I, Gursoy UK, Demirer S, Sezer H. Periodontal status of chronic renal failure patients receiving hemodialysis. *Yonsei Med J*. 2003 Aug 30;44(4):648-52.
- 19- Matos SB, Meyer R, Lima FWM. Citomegalovírus: Uma revisão da patogenia, epidemiologia e diagnóstico da infecção. *Rev.Saúde.Com* 2011; 7(1): 44-57.
- 20- Pang XL, Fox JD, Fenton JM, Miller GG, Caliendo AM. Interlaboratory comparison of cytomegalovirus viral load assays. *Am J Transplant*. 2009 Feb; 9(2): 258-68.
- 21- Parkar SM, Ajithkrishnan CG. Periodontal status in patients undergoing hemodialysis. *Indian J Nephrol*. 2012 Jul; 22(4):246-50.
- 22- Pliquett RU, Klein C, Grunewald T, Ruf BR, Beige J. Lack of evidence for systemic cytomegalovirus reactivation in maintenance hemodialysis patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2011) 30:1557–1560.
- 23- Ross SA, Novak Z, Pati S, Boppana SB. Diagnosis of cytomegalovirus infection. *Infect Disord Drug Targets*. 2011 Oct; 11(5): 466–474.
- 24- Sekiguchi RT, Pannuti CM, Silva HJ, Medina-Pestana JO, Romito GA. Decrease in oral health may be associated with length of time since beginning dialysis. *Spec Care Dentist*. 2012 Jan-Feb; 32(1):6-10.
- 25- Souza CRD, Libério SA, Guerra RNM, Monteiro S, Silveira EJD, Pereira ALA. Avaliação da condição periodontal de pacientes renais em hemodiálise. *Rev Assoc Med Bras* 2005; 51(5): 285-9.
- 26- Vilibic-Cavlek T, Kolaric B, Ljubin-Sternak S, Kos M, Kaic B, Mlinaric-Galinovic G. Prevalence and dynamics of cytomegalovirus infection among patients undergoing chronic hemodialysis. *Indian J Nephrol*. 2015 Mar-Apr; 25(2):95-8.
- 27- Wahid A, Chaudhry S, Ehsan A, Butt S, Khan AA. Bidirectional relationship between chronic kidney disease & periodontal disease. *Pak J Med Sci*. 2013 Jan; 29(1):211-5
- 28- Yamalik N, Delibasi L, Gulay H, Caglayan F, Haberal M, Caglayan G. The histological investigation of gingiva from patients with chronic renal failure, renal transplants, and periodontitis: a light and electron microscopic study. *J Periodontol* 1991 Dec; 62:737-44.
- 29- Yoshioka M, Shirayama Y, Imoto I, Hinode D, Yanagisawa S, Takeuchi Y. Current status of collaborative relationships between dialysis facilities and dental facilities in Japan: Results of a Nationwide survey. *BMC Nephrol*. 2015 Feb 12; 16:17.
- 30- Yun Z, Lewensohn-Fuchs I, Ljungman P, Ringholm L, Jonsson J, Albert J. A real-time TaqMan PCR for routine quantitation of cytomegalovirus DNA in crude leukocyte lysates from stem cell transplant patients. *J Virol Methods*. 2003 Jun 9;110(1):73-9.

TABELAS

Tabela 1 - Distribuição das variáveis grau/extensão da periodontite e presença de CMV segundo o tempo de hemodiálise

Variáveis	Tempo de Tratamento						Total		p-valor ¹
	Até 12 meses		De 13 a 24 meses		Acima de 24 meses				
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Periodontite									
Sem periodontite	5	50,0	1	10,0	4	40,0	10	100,0	0,060
Leve e Localizada	4	44,4	1	11,1	4	44,4	9	100,0	
Moderada e Localizada	0	0,0	0	0,0	7	100,0	7	100,0	
Moderada e Generalizada	3	42,9	2	28,6	2	28,6	7	100,0	
Severa e Localizada	0	0,0	1	100,0	0	0,0	1	100,0	
Severa e Generalizada	10	50,0	3	15,0	7	35,0	20	100,0	
CMV									
Positivo	12	41,4	3	10,3	14	48,3	29	100,0	0,588
Negativo	10	40,0	5	20,0	10	40,0	25	100,0	
Total	22	40,7	8	14,8	24	44,4	54	100,0	

(1): Resultado obtido através do teste da Razão de Verossimilhança

Tabela 2 - Distribuição dos grupos caso e controle segundo as variáveis gengivite; grau e localização da periodontite; presença de CMV

Variáveis	Grupo				Total		p-valor	OR	IC95%		
	Caso		Controle								
	n	%	n	%	n	%					
Grau da Periodontite											
Sem Periodontite	10	18,5	9	16,4	19	17,4	0,960 ¹				
Leve	9	16,7	8	14,5	17	15,6					
Moderada	14	25,9	14	25,5	28	25,7					
Severa	21	38,9	24	43,6	45	41,3					
Extensão da Periodontite											
Sem periodontite	10	18,5	9	16,4	19	17,4	0,763 ¹				
Localizada	17	31,5	21	38,2	38	34,9					
Generalizada	27	50,0	25	45,5	52	47,7					
CMV											
Positivo	29	53,7	-	-	29	26,6	*0,001 ²	3,20	2,31	4,43	
Negativo	25	46,3	55	100,0	80	73,4					
Total	54	100,0	55	100,0	109	100,0					

(1): Resultados obtidos pelo Teste qui-quadrado de Pearson; (2): teste Exato de Fisher; OR=Odd Ratio; IC95%=Intervalo de Confiança de 95%; (*): Diferença estatisticamente significante (p<0,05)

Tabela 3 - Medidas descritivas das variáveis idade, tempo de tratamento e escolaridade segundo o grau de periodontite no grupo caso e no grupo controle.

Variável / Grau Periodontite	Grupo Caso				Pos Hoc	Grupo Controle				Pos Hoc
	N	Média	DP	p-valor ¹		N	Média	DP	p-valor ¹	
Idade										
Sem Periodontite	10	33,2	9,7	0,001*	A	9	37,7	7,3	0,002*	A
Leve	9	34,6	11,7		A	8	43,6	13,7		AB
Moderada	14	50,4	11,1		B	14	44,5	8,4		AB
Severa	21	55,4	11,2		B	24	51,8	10,5		CB
Tempo Tratamento										
Sem Periodontite	10	35,4	34,8	0,202		-	-	-	-	
Leve	9	53,4	67,7			-	-	-		
Moderada	14	56,4	40,1			-	-	-		
Severa	21	27,8	28,4			-	-	-		
Escolaridade										
Sem Periodontite	10	4,2	1,5	0,024*	A	9	4,7	0,9	0,012*	A
Leve	9	3,8	1,7		AB	8	3,8	1,4		B
Moderada	14	2,3	1,0		CB	14	3,4	1,2		B
Severa	21	3,5	1,8		AB	24	3,0	1,1		B

(1): Resultados obtidos pelo teste não paramétrico de Kruskal Wallis; Pos-Hoc com teste de Mann-Whitney (letras iguais não diferem estatisticamente); DP = Desvio-padrão; (*): Diferença estatisticamente significativa (p<0,05)

Tabela 4 - Avaliação das medidas descritivas das variáveis idade, escolaridade, percentual de faces com sangramento e com placa segundo os grupos caso e controle.

Variável / Grupo	N	Média	DP	p-valor ¹
Idade				
Caso	54	46,5	14,4	0,739
Controle	55	46,4	11,1	
Escolaridade				
Caso	54	3,4	1,7	0,398
Controle	55	3,5	1,3	
% faces com sangramento				
Caso	54	12,7	14,2	0,001*
Controle	55	21,4	14,7	
% faces com placa				
Caso	54	12,2	15,0	0,249
Controle	55	12,6	10,5	

(1): Resultados obtidos pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney; DP = Desvio-padrão; (*): Diferença estatisticamente significativa (p<0,05)

APÊNDICE B - FICHA CLÍNICA PERIODONTAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

FICHA CLÍNICA

**DETECÇÃO DA PRESENÇA DE CMV POR RT-PCR E AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS
CLÍNICOS PERIODONTAIS EM PACIENTES RENAIIS CRÔNICOS SUBMETIDOS A
HEMODIÁLISE**

Grupo: () Saudáveis () Hemodiálise

1. Nome: _____
2. Nacionalidade: _____
3. Sexo: _____
4. Idade: _____
5. Estado civil: _____
6. Fone: _____ Celular: _____
7. Hábito de fumar:
() nunca fumou
() ex-fumante: _____ (anos que parou)
() fumante: _____ (quantos por dia)
8. Profissão: _____
9. Escolaridade:
 - I. () Não sabe ler ou escrever
 - II. () 1º grau incompleto
 - III. () 1º grau completo
 - IV. () 2º grau incompleto
 - V. () 2º grau completo
 - VI. () Universidade incompleta
 - VII. () Universidade completa
 - VIII. () Pós-graduação
 - IX. () Não sei
10. Já fez ou faz hemodiálise? Quanto tempo? _____
11. Já realizou transplante renal? Quanto tempo? _____
12. Medicamentos que utiliza: _____
13. Apresente alguma doença sistêmica? _____

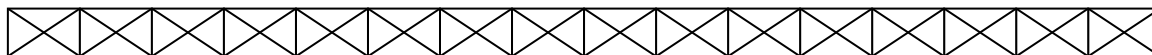
FICHA PERIODONTAL

PACIENTE: _____

DATA: _____

Dente	Sondagem (mm)						Recessão Gengival (mm)						Furca			Mob
	Vestibular			Palatina			Vestibular			Palatina						
	D	C	M	D	C	M	D	C	M	D	C	M	M	D	P	
18																
17																
16																
15																
14																
13																
12																
11																
21																
22																
23																
24																
25																
26																
27																
28																
38																
37																
36																
35																
34																
33																
32																
31																
41																
42																
43																
44																
45																
46																
47																
48																

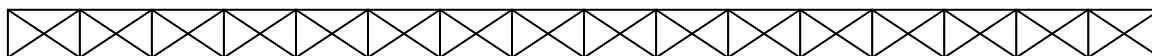
SANGRAMENTO: Faces _____ % _____



18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38



PLACA: Faces _____ % _____



18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38



ANEXO A - NORMAS DA REVISTA JOURNAL OF APPLIED ORAL SCIENCE

1 SCOPE

The **Journal of Applied Oral Science** is committed in publishing the scientific and technologic advances achieved by the dental and speech-language pathology and audiology communities, according to the quality indicators and peer reviewed material, with the objective of assuring its acceptability at the local, regional, national and international levels. The primary goal of The Journal of Applied Oral Science is to publish the outcomes of original investigations as well as invited case reports and invited reviews in the field of Oral Sciences, with emphasis in dentistry, speech-language pathology and audiology, and related areas.

This Journal adopts Creative Commons license CC-BY:

"This license lets others distribute, remix, tweak, and build upon your work, even commercially, as long as they credit you for the original creation. This is the most accommodating of licenses offered. Recommended for maximum dissemination and use of licensed materials."

There is no fee to authors for submitting to the JAOS nor Article Processing Charge (APC).

2 General Guidelines

2.1 The papers sent for publication must be original and the simultaneous submission to other journal, either national or international, is not allowed. The Journal of Applied Oral Science shall retain the copyright of all papers published, including translations, yet allowing future reproduction as a transcription, provided the source is properly mentioned.

2.2 Only papers written in the English language shall be accepted, and the authors are fully responsible for the texts, citations and references.

2.3 The Journal of Applied Oral Science has the right to submit all manuscripts to the Editorial Board, which is fully authorized to settle the convenience of their acceptance, or return them to the authors with suggestions for modifications in the text and/or for adaptation to the editorial rules of the Journal. In this case, the manuscript will be re-evaluated by the Editor-in-Chief and Editorial Board.

2.4 The Journal of Applied Oral Science will receive literature reviews and case reports only upon invitation by the Editor.

2.5 The concepts stated on the papers published are full responsibility of the authors and do not necessarily reflect the opinion of the Editor-in-Chief and Editorial Board.

2.6 The dates of receipt of the original paper and its acceptance will be indicated in the occasion it is published.

2.7 Each corresponding author will receive one copy of the Journal. Additional reprints may be supplied upon request and must be paid by the authors.

2.8 Depending on the financial resources of the Journal of Applied Oral Science or the authors, color illustrations will be published at the discretion of the Editor-in-Chief.

3 Revision Criteria

3.1 Technical review: manuscripts will be firstly evaluated regarding presentation according to the instructions for authors and presence of mandatory documents required for submission. Manuscripts not in accordance with instructions will be returned to authors for adjustments before being reviewed by Associate Editors and referees.

3.2 Pre-evaluation: manuscripts in accordance with the instructions will be appreciated by Associate Editors regarding its adequacy to Journal scope and the presentation of all required documents. Papers considered inadequate will be rejected and returned to authors.

3.3 Merit and content evaluation: papers approved by Associate Editors will be evaluated in their scientific merit and methods by at least two ad hoc referees from different institutions of that of the authors, besides the Editor-in-Chief. Editor-in-Chief will decide on manuscript acceptance. When revision of the original is required, the manuscript will be returned to the corresponding author for modification. A revised version with modifications will be re-submitted by the authors, and that will be re-evaluated by the Editor-in-Chief and Editorial Board, if necessary.

3.4 After approval of the scientific merit, manuscripts will pass through a final review performed by a professional assigned by the JAOS. The costs of this service will be under the authors' responsibility, and instructions regarding the necessary procedures, the value of the service and the payment directly to the professional will be forwarded to the corresponding author. If manuscripts are still considered inadequate, they will be returned to authors for revision.

3.5 Authors and referees will be kept anonymous during the review process.

3.6 Contents of the manuscript are the authors' responsibility and do not reflect the opinion of the Editor-in-Chief or Editorial Board.

4 Galley Proofs

4.1 Galley proofs will be sent to the corresponding author by electronic mail in pdf format for final approval.

4.2 Approval of galley proofs by the corresponding author should be returned with corrections, if necessary, within 72 hours.

4.3 If not returned within 72 hours, the Editor-in-Chief will consider the present version the final, and will not allow further modifications. Corrections in the galley proofs should be restricted to minor mistakes that do not modify the content of the manuscript. Major corrections will imply that the manuscript should enter the review process again.

4.4 Inclusion of new authors is not allowed at this phase of the publication process.

Form and preparation of manuscripts

1 Presentation of the Manuscript

1.1 Structure of the manuscript

Cover page (must be submitted as a supplementary file through the online submission system) which should contain only:

- Title of the manuscript in English.
- Names of the authors in direct order with their respective degrees and affiliations in English.
- Full address of the corresponding author, to whom all correspondence should be addressed, including fax and phone number as well as e-mail address.

1.2 Text

- The paper must be previously translated or reviewed by professional or company responsible for English language. The costs of this service will be under the authors' responsibility. Authors with English as native language must submit as supplementary file a signed letter taking responsibility for the quality of the English language and editing of the text.
- Title of the manuscript and subtitle, if necessary, in English.
- Abstract: should comprise at most 300 words, highlighting a little introduction, objective, material and methods, results and conclusions.
- Key words: (words or expressions that identify the contents of the manuscript). The authors are referred to the list of subjects of the "Index Medicus" and DeCS (Health Sciences Descriptors available at <http://decs.bvs.br/l/homepagei.html/>). Authors must use periods to separate the key words, which must have the first letter of the first word in capital letters. Ex: Dental implants. Fixed prosthesis. Photoelasticity. Passive fit.
- Introduction: summary of the rationale and proposal of the study including only proper references. It should clearly state the hypothesis of the study.
- Material and Methods: the material and the methods are presented with enough detail to allow confirmation of the findings. Include city, state and country of all manufacturers right after the first appearance of the products, reagents or equipments. Published methods should be referred to and briefly discussed, except if modifications were made. Indicate the statistical methods employed, if applicable. Please refer to item 3 for ethical principals and registration of clinical trials.
- Results: presents the outcomes in a logical sequence in the text, tables and illustrations. Data contained in tables and illustrations should not be repeated in the text, and only important findings should be highlighted.
- Discussion: this should emphasize the new and important aspects of the study and the resulting conclusions. Any data or information mentioned in the introduction or results should not be repeated. Findings of other important studies should be reported. The authors should point out the implications of their findings as well as their limitations.
- Conclusion(s) (if any).
- Acknowledgments (when appropriate). Acknowledge those who have contributed to the work. Specify sponsors, grants,

scholarships and fellowships with respective names and identification numbers.

- References (please refer to item 2.3)

2 TECHNICAL NORMALIZATION

The manuscript should be typed as follows: 1.5 spacing in 11 pt Arial font, with 3-cm margins at each side, on an A4 page, adding up to at most 15 pages, including the illustrations (graphs, photographs, tables, etc). The authors should keep a copy of the manuscript for possible requests.

2.1 Illustrations and Tables

2.1.1 The illustrations (photographs, graphs, drawings, charts, etc.), regarded as figures, should be limited to the least amount possible and should be uploaded in separate files, consecutively numbered with Arabic numbers according to the order they appear in the text.

2.1.2 Photographs should be sent in original colors and digitized in .jpg or tif formats with at least 10 cm width and at least 300 dpi. These illustrations should be provided in supplementary files and not inserted in the Word document.

2.1.3 The corresponding legends for figures should be clear, concise and typed at the end of the manuscript as a separate list preceded by the corresponding number.

2.1.4 The tables should be logically arranged, consecutively numbered with Arabic numbers. The legend shall be placed on the top of the tables. Tables should be open in the right and left laterals.

2.1.5 Footnotes should be indicated by asterisks and restricted to the least amount possible.

2.2 Citation of the Authors

Citation of the authors in the text may be performed in two manners:

1) Just numeric: " and interfere with the bacterial system and tissue system^{3,4,7-10}". References must be cited in a numeric ascending order within the paragraph.

2) or alphanumeric

- one author - Silva²³ (1986)
- two authors - Silva and Carvalho²⁵ (1987)
- three authors - Ferreira, Silva and Martins²⁷ (1987)
- more than three authors- Silva, et al.²⁸ (1988)
- Punctuation characters such as periods and commas must be placed after the numeric citation of the authors. Ex: Ferreira³⁸.

2.3 References

The references must follow the "Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journals - Vancouver" available at: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

2.3.1 All references must be cited in the text. They should be alphabetically ordered by the last name of the author and numbered in increasing order accordingly. The order of citation in the text should follow these numbers. Abbreviations of the titles of the international journals cited should follow the Index Medicus/MEDLINE.

2.3.2 Personal communications and unpublished data with no publication date must not be included in the reference list.

2.3.3 Abstracts, monographs, dissertations and theses will not be accepted as references.

2.3.4 The names of all authors should be cited up to 6 authors; in case there are more authors, the 6 first authors should be cited, followed by the expression ", et al.", which must be followed by "period" and should not be written in italics. Ex: Uhl, et al.

2.3.5 At most 30 references may be cited, except for invited reviews by the Editor-in-Chief.

Examples of references:

Book

Melberg JR, Ripa LW, Leske GS. Fluoride in preventive dentistry: theory and clinical applications. Chicago: Quintessence; 1983.

Book chapter

Verbeeck RMH. Minerals in human enamel and dentin. In: Driessens FCM, Woltgens JHM, editors. Tooth development and caries. Boca Raton : CRC Press; 1986. p.95-152.

Papers published in journals

Wenzel A, Fejerskov O. Validity of diagnosis of questionable caries lesions in occlusal surfaces of extracted third molars. Caries Res. 1992;26:188-93.

Papers with more than 6 authors

The first 6 authors are cited, followed by the expression ", et al."

Parkin DM, Clayton D, Black RJ, Masuyer E, Friedl HP, Ivanov E, et al. Childhood - leukemia in Europe after Chernobyl : 5 years follow-up. Br J Cancer. 1996;73:1006-12.

Papers without authors' names

Seeing nature through the lens of gender. *Science*. 1993;260:428-9.

Volume with supplement and/or Special Issue

Davidsen CL. Advances in glass-ionomer cements. *J Appl Oral Sci*. 2006;14(sp. Issue):3-9.

Entire issue

Dental Update. Guildford 1991;18(1).

The authors are fully responsible for the correctness of the references.

3 ETHICAL PRINCIPLES AND REGISTRATION OF CLINICAL TRIALS

3.1 Experimental procedures in humans and animals

The Journal of Applied Oral Science reassures the principles incorporated in the Helsinki Declaration and insists that all research involving human beings, in the event of publication in this journal, be conducted in conformity with such principles and others specified in the respective ethics committees of authors' institution. In the case of experiments with animals, such ethical principles must also be followed. When surgical procedures in animals were used, the authors should present, in the Material and Methods section, evidence that the dose of a proper substance was adequate to produce anesthesia during the entire surgical procedure. All experiments conducted in human or animals must accompany a description, in the Material and Methods section, that the study was approved by the respective Ethics Committee of authors' affiliation and provide the number of the protocol approval.

3.1.1 Papers presenting **clinical trials or clinical studies in human volunteers or in animals** must contain the Ethical Committee approval of the reports of the **results** presented for publication as **mandatory supplementary file**.

3.2 Clinical Trial Registration - International Standard Randomized Controlled Trial Number (ISRCTN)

The Journal of Applied Oral Science supports the policies of the World Health Organization (WHO) and the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) for the registration of clinical trials. The journal recognizes the importance of such initiatives for the registration and international publication of clinical studies with an open access. Therefore, the Journal of Applied Oral Science will publish only those clinical trials that have previously received an identification number, the ISRCTN, validated by the criteria established by the WHO and ICMJE. The WHO defines clinical trials as "any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes. Interventions include but are not restricted to drugs, cells and other biological products, surgical procedures, radiologic procedures,

devices, behavioral treatments, process-of-care changes, preventive care, etc".

3.2.1 Manuscripts presenting clinical trials in human volunteers must be submitted with the following mandatory supplementary files:

- CONSORT 2010 checklist (<http://www.consort-statement.org/>);
- registration number of the research in a database that meets the requirements of the World Health Organization (WHO) and the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE)
- Suggestions: for Brazilian authors: <http://www.ensaioclinicos.gov.br/>
- Suggestions for Brazilian and non-Brazilian authors: <http://www.controlled-trials.com/> (ISRCTN) or <http://prsinfo.clinicaltrials.gov>.

3.3 The Editor-in-Chief and the Editorial Board reserve the right to refuse manuscripts that show no clear evidence that the methods used were not appropriate for experiments in humans or animals.

4 ANY QUERIES SHALL BE SOLVED BY THE Editor-in-Chief AND EDITORIAL BOARD

Sending of manuscripts

1 MANUSCRIPT SUBMISSION

1.1 Articles must be submitted through the following address <http://www.scielo.br/jaos>

1.2 The original file containing the main manuscript must be submitted without the authors' identification and affiliations. The cover page must be submitted as a supplementary file containing the names of the authors, affiliations and correspondence address.

1.3 Figures must be submitted as supplementary files according to the specifications of item 2.1 regarding the form and preparation of manuscripts.

1.4 - Tables must be prepared in Excel format and must be submitted as a supplementary files.

1.5 Files such as registration number of clinical trial or Ethics Committee approval must be sent as mandatory supplementary files.

1.6 The letter from the author responsible for English language or from a professional or company responsible for translation or review must be submitted as mandatory supplementary file.

1.7 The [submission form](#), signed by ALL the authors, must be submitted as a supplementary file containing the following text:

By signing the Submission Form, the authors state:

Copyright transfer: In the event of publication of the above mentioned manuscript, we, the authors, agree with the use of Creative Commons license CC-BY and transfer to the **Journal of Applied Oral Science** all rights and interest of the manuscript. This document applies to translations and any preliminary presentation of the contents of the manuscript that has been accepted, but yet not published. If any authorship modification occurs after submission, a document with of agreement of all authors is required to be kept by the Editor-in-Chief. Exclusion of authors may only be accepted by his/her own request.

Responsibilities of the authors:

I hereby state that:

The content is original and does not consist of plagiarism or fraud;

The work is not under consideration or will be submitted to other journal until a final decision is issued by this journal;

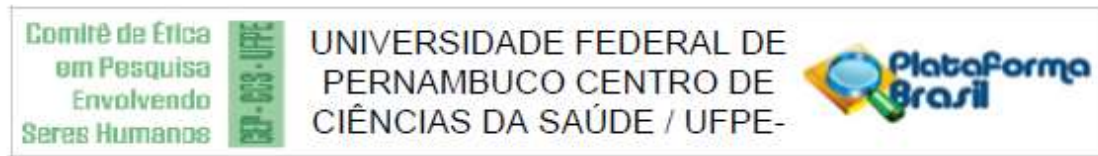
I have effectively contributed to this work and am familiar with its contents;

I have read the final version and assume the responsibility for its contents. I understand that if the work, or part of it, is considered deficient or a fraud, I take shared responsibility with the other authors.

Release of conflict of interest:

All my affiliations, corporate or institutional, and all sources of financial support to this research are properly acknowledged, except when mentioned in a separate letter. I certify that do not have any commercial or associate interest that represents a conflict of interest in connection with the submitted manuscript.
 PRINT NAME: _____ SIGNATURE: _____ DATE: _____

ANEXO B - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DA UFPE



DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Detecção da presença de EBV e CMV por PCR e avaliação de parâmetros clínicos periodontais em portadores de doença renal crônica e transplantados renais

Pesquisador: Mariana de Moraes Corrêa Perez

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 52257316.0.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.445.608

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de mestrado que será desenvolvido por Mariana de Moraes Corrêa Perez, sob orientação da Dra. Alessandra de Albuquerque Tavares Carvalho e co-orientação do Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros, com colaboração de Barbara Souza Luz Prazeres. O trabalho será desenvolvido no Hospital das Clínicas de Pernambuco, Clínica Nefromais (localizada no Hospital Maria Lucinda), Clínica de Estomatologia da UFPE e Laboratório de Biologia Molecular II da Pós-Graduação em Odontologia.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a presença do vírus Epstein-Barr, citomegalovírus e correlacionar com a condição periodontal em indivíduos saudáveis e em pacientes em tratamento com hemodiálise e transplantados renais. A condição periodontal será avaliada pela profundidade de sondagem, sangramento a sondagem e presença de placa visível.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: constrangimento durante anamnese, pequeno desconforto durante a avaliação periodontal e ocorrência de hematoma pós-coleta de sangue e dor durante a coleta sanguínea. Os riscos serão minimizados pelo pessoal técnico.

Benefícios: os pacientes diagnosticados com problemas periodontais poderão ser acompanhados na Clínica de Estomatologia da UFPE ou encaminhados a outros serviços da UFPE, caso necessitem de outros atendimentos odontológicos. Para aqueles pacientes que apresentarem carga viral positiva seus médicos responsáveis tomarão conhecimento da infecção.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Comentários e considerações: O estudo apresenta-se bem delineado e com proposta clara. Ademais, parece exequível e viável.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Recomendo aprovação

Considerações Finais a critério do CEP:

As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via “Notificação”, pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link “Para enviar Relatório Final”, disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_645139.pdf	08/03/2016 21:40:27		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.docx	08/03/2016 21:38:06	Mariana de Moraes Corrêa Perez	Aceito
Outros	Curriculo_colaboradora_Barbara.docx	05/01/2016 00:00:44	Mariana de Moraes Corrêa Perez	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rostro.pdf	03/01/2016 22:46:20	Mariana de Moraes Corrêa Perez	Aceito
Outros	Curriculo_Coorientador_Luiz.docx	03/01/2016 22:33:31	Mariana de Moraes Corrêa Perez	Aceito
Outros	Curriculo_Orientadora_Alessandra.docx	03/01/2016 22:32:54	Mariana de Moraes Corrêa Perez	Aceito
Outros	Curriculo_Mariana.docx	03/01/2016 22:31:49	Mariana de Moraes Corrêa Perez	Aceito
Outros	Carta_nefromais.jpg	03/01/2016 22:30:56	Mariana de Moraes Corrêa Perez	Aceito
Outros	Carta_laboratorio.jpg	03/01/2016 22:29:57	Mariana de Moraes Corrêa Perez	Aceito
Outros	Carta_estomatologia.jpg	03/01/2016 22:29:09	Mariana de Moraes Corrêa Perez	Aceito
Outros	Carta_HC.jpg	03/01/2016 22:27:58	Mariana de Moraes Corrêa Perez	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	03/01/2016 22:26:04	Mariana de Moraes Corrêa Perez	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não