TALITA DE CASTRO ALVES

**Detecção dos poliomavírus humano BK e JC em fluidos orais de indivíduos
com insuficiência renal crônica e transplantados renais**

São Paulo
2015

TALITA DE CASTRO ALVES

**Deteccão dos poliomavírus humano BK e JC em fluidos orais de indivíduos
com insuficiência renal crônica e transplantados renais**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Patologia e Estomatologia Básica e Aplicada

Orientadora: Profa. Dra. Marina Helena Cury Gallottini

São Paulo

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Alves, Talita de Castro.

Detecção dos poliomavírus humano BK e JC em fluidos orais de indivíduos com insuficiência renal crônica e transplantados renais / Talita de Castro Alves ; orientador Marina Helena Cury Gallottini. -- São Paulo, 2015.

60p. : tab.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Patologia e Estomatologia Básica e Aplicada. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Poliomavírus humano. 2. Insuficiência renal crônica. 3. Transplante de rim. 4. Saliva. 5. Fluido crevicular gengival. I. Gallottini, Marina Helena Cury. II. Título.

Alves TC. Detecção dos poliomavírus humano BK e JC em fluidos orais de indivíduos com insuficiência renal crônica e transplantados renais. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /2015

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho à minha família.

Meus pais Marcos e Neide, meu irmão Marcos e meu marido Moisés.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por tornar este sonho realidade.

Aos meus pais, Marcos e Neide, as pessoas mais importantes da minha vida. Vocês são e sempre serão minha inspiração!

Ao meu marido Moisés, meu amor, meu amigo e o maior incentivador da realização deste trabalho.

Ao meu irmão Marcos e à minha cunhada Glaura, pelo apoio e pela alegria contagiante que me ajudaram a concluir este trabalho.

À minha orientadora Marina Gallottini, pelo acolhimento, paciência e ensinamentos. É uma honra tê-la como orientadora!

À professora Adriana Ortega, pelos ensinamentos e pelo encorajamento.

Às professoras Karem Ortega, Nathalie Rezende e Fabiana Martins. Pelos ensinamentos e incentivo aos estudos a pacientes especiais.

Ao professor Cláudio Pannuti, pela motivação, parceria e auxílio, fundamentais na execução deste trabalho.

Aos professores Paulo Braz e Maria Cristina Fink, pelos ensinamentos e auxílio. Obrigada pela parceria e por tornar este trabalho possível.

Aos professores do Departamento de Patologia Bucal da FOUSP, Suzana, Marília, Décio e especialmente ao professor Fábio Daumas, por disponibilizar e confiar o seu laboratório a mim, durante a execução deste trabalho.

Aos meus queridos amigos da pós-graduação, em especial Karin, Marília, Dani, Fred, Malu, Cíntia e Carol. Vocês são a energia positiva deste trabalho!

Às minhas amigas e colegas de trabalho do CAPE-FOUSP, Gil, Sandra, Cris, Jeanne, Andressa, Bel e Leninha. Obrigada pelo companheirismo, pela amizade, pelas conversas e risadas. Vocês fazem parte deste trabalho!

À Rosemary, enfermeira da FOUSP, por sempre se dispor a ajudar nas coletas desta pesquisa.

Aos funcionários da secretaria do departamento de Patologia Bucal, Zilda, Néia, Vinícius e Fátima por toda a orientação e auxílio em todos os momentos desse meu curso de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

A todas as pessoas que aceitaram participar desta pesquisa.

“A mente que se abre a uma nova ideia, jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

RESUMO

Alves TC. Detecção dos poliomavírus humano BK e JC em fluidos orais de indivíduos com insuficiência renal crônica e transplantados renais [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Corrigida.

Novas abordagens clínicas para o diagnóstico e monitoramento de pessoas com doenças sistêmicas têm sido empregadas, através da utilização de fluidos biológicos orais, como a saliva e o fluido gengival crevicular (FGC). Alguns autores têm avaliado o potencial desses fluidos no diagnóstico e acompanhamento de doenças, por apresentarem vantagens tais como coleta não invasiva e segurança no manuseio. Até o presente momento, poucos trabalhos detectaram os poliomavírus humano BK (BKV) e JC (JCV) em saliva e nenhum trabalho procurou sua presença no FGC. Esses poliomavírus infectam assintomaticamente cerca de 80% da população geral, mantendo-se latente no trato urinário. No caso de imunossupressão mediada por células, pode ocorrer o aumento da replicação e indução de reação inflamatória. Uma das doenças causadas pela replicação do BKV é a nefropatia associada ao poliomavírus (NAP), caracterizada pela disfunção e perda do próprio rim ou do rim transplantado, enquanto a Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva (LMP), causada pela replicação do JCV, infecta os oligodendrócitos, causando desmielinização. Métodos não invasivos para o *screening* dos poliomavírus podem facilitar a detecção de novos casos e a monitoração de casos previamente conhecidos. O objetivo deste estudo foi avaliar a detecção e quantificação do BKV e JCV em fluidos orais (saliva, lavado bucal e FGC) de indivíduos com insuficiência renal crônica (IRC), transplantados renais (TR), e controles em relação ao sangue e urina, fluidos frequentemente usados para esse teste. Para tanto, foram incluídos no estudo 38 sujeitos, divididos em 3 grupos, sendo 14 indivíduos no grupo com IRC (GIR), 12 TR no grupo transplantado renal (GTR) e 12 indivíduos saudáveis no grupo controle (GC). No total, foram coletadas 283 amostras dos participantes, sendo 151 de FGC, 38 amostras de saliva, 38 de lavado bucal, 35 de soro e 21 amostras de urina. No GIR, 100% (14) dos indivíduos apresentaram positividade para BKV em pelo menos uma amostra analisada e 14% (2) foram positivos para JCV. No GTR, 91,7% (11) dos indivíduos foram positivos

para BKV e 51,7% (5) foram positivos para JCV. Dentre os sujeitos do GC, 91,7% (11) foram positivos para BKV e 50% (6) para JCV, em pelo menos uma amostra testada. Não houve diferença de frequência de detecção viral entre os 3 grupos de participantes, com relação às amostras coletadas. As amostras de fluidos orais (saliva, lavado e FGC) exibiram alta prevalência de detecção, principalmente do BKV, com muitas amostras com níveis quantificáveis de carga viral. Concluímos que fluidos orais são viáveis na detecção do BKV e JCV.

Palavras-chave: Poliomavírus humano BK. Poliomavírus humano JC. Rastreamento. Insuficiência renal crônica. Transplante renal. Saliva. Fluido gengival crevicular. PCR.

ABSTRACT

Alves TC. Polyomavirus BK and JC in oral fluids of individuals with chronic kidney failure and kidney transplantation [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Corrigida.

New clinical approaches for diagnosis and monitoring of individuals with systemic diseases have been employed through the use of oral biological fluids such as saliva and gingival crevicular fluid (GCF). Some authors have evaluated the potential of these fluids in the diagnosis and monitoring of diseases, because they have advantages such as noninvasive collection and safe handling. To date, few studies have demonstrated the detection of human polyomavirus BK (BKV) and JC (JCV) in saliva and no study reached for its presence in GCF. These polyomavirus infect asymptotically around 80% of general population, remaining latent in the urinary tract. In case of immunosuppression mediated by cells, there is increased inflammation and induction of replication. One of the diseases caused by BKV replication is polyomavirus associated to the nephropathy (PVAN), characterized by the dysfunction or loss of the kidney or transplanted kidney, while the progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) is caused by replication of JCV, infects oligodendrocytes causing demyelination. Noninvasive screening could facilitate the detection of new cases and monitoring of cases previously known. The objective of this study was to evaluate the BKV and JCV detection and quantification in oral fluids (saliva, mouthwash and GCF) of individuals with chronic kidney failure (CKF), kidney transplantation (KT), and controls compared with blood and urine, often used for this test. Therefore, were included 38 subjects, divided into 3 groups, being 14 individuals with CKF (KFG), 12 individuals with KT (KTG) and 12 healthy control individuals (CG). In a total, were collected 283 samples, being 151 of GCF, 38 of saliva, 38 of mouthwash, 35 of serum and 21 samples of urine. In the KFG, 100% (14) of the individuals were positive for BKV in at least one of the collected sample and 14% (2) were positive for JCV. In the KTG, 91.7% (11) were positive for BKV and 51.7% for JCV. Among the subjects of the CG, 91.7% (11) were positive for BKV and 50% (6) to JCV, in at least one tested sample. There was no difference in viral detection frequency between the 3 studied groups with respect to the collected samples. Oral fluids samples (saliva, mouthwash and GCF) exhibited high prevalence of detection, especially of BKV, and several samples showed detectable

viral load. We conclude that oral fluids are feasible for detect and can be used for screening of BKV and JCV.

Keywords: Human polyomavirus BK. Human polyomavirus JC. Screening. Chronic kidney failure. Kidney transplant. Saliva. Crevicular gingival fluid. PCR.

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Oligonucleotídeos e sondas responsáveis pela amplificação dos fragmentos através do PCR tempo real.....	36
Tabela 5.1 - Dados demográficos e iniciais dos sujeitos da pesquisa.	37
Tabela 5.2 - Número e percentagem de indivíduos positivos para o BKV em cada grupo nas diferentes amostras.	39
Tabela 5.3- Número e percentagem de indivíduos positivos para o JCV em cada grupo nas diferentes amostras	39
Tabela 5.4- Associação entre a urina e a saliva com relação a detecção do BKV.	40
Tabela 5.5- Associação entre a urina e o lavado bucal com relação a detecção do BKV.	40
Tabela 5.6- Associação entre a urina e o FGC com relação a detecção do BKV.....	40
Tabela 5.7- Associação entre presença de doença periodontal nos sítios com presença do BKV em fluido gengival crevicular (FGC).....	40
Tabela 5.8- Associação entre presença de doença periodontal nos sítios com presença do JCV em fluido gengival crevicular (FGC).....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag-T	antígeno T
BKV	poliomavírus humano BK
CAPE	Centro de Atendimento a Pacientes Especiais
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DNA	ácido desoxiribonucleico
DPAC	diálise peritoneal ambulatorial contínua
DPCC	diálise peritoneal cíclica contínua
EBV	epstein-barr vírus
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FGC	fluido gengival crevicular
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
GC	grupo controle
GIR	grupo insuficiência renal
GTR	grupo transplantado renal
HHV-6	herpes vírus tipo 6
HIV	vírus da imunodeficiência adquirida
ICP	índice comunitário periodontal
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
IMTSP	Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
IRC	insuficiência renal crônica
JCV	poliomavirus humano JC
LMP	leucoencefalopatia multifocal progressiva
NAP	nefropatia associada ao poliomavírus
OMS	organização mundial da saúde
PCR	polimerase chain reaction
RNA	ácido ribonucleico
RNA-m	ácido ribonucleico mensageiro
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TFG	taxa de filtração glomerular
TR	transplantado renal
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

pH	potencial hidrogeniônico
ml/min	mililitro por minuto
®	produto com marca registrada
ml	mililitro
°C	graus Celsius
pb	partes por bilhão
µl	microlitro
µM	micro mol
POS NQ	positivo não quantificável
cp/ml	cópias por mililitro de amostra

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 FLUIDOS ORAIS E DIAGNÓSTICO	17
2.2 POLIOMAVÍRUS HUMANO BK E JC	19
2.3 INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA E TRANSPLANTE RENAL	25
3 PROPOSIÇÃO	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 MATERIAL.....	30
4.2 MÉTODOS	31
4.2.1 Atendimento às normas de bioética	31
4.2.2 Anamnese	31
4.2.3 Análise de Doença Periodontal	32
4.2.4 Coleta da Fluido Gengival Crevicular	33
4.2.5 Coleta de Saliva	33
4.2.6 Coleta do Lavado Bucal	34
4.2.7 Coleta de Sangue.....	34
4.2.8 Coleta de Urina.....	35
4.2.9 Procedimentos Laboratoriais	35
4.2.10 Análise Estatística	36
5 RESULTADOS	37
6 DISCUSSÃO	42
7 CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS	48
APÊNDICES	53
ANEXOS	58

1 INTRODUÇÃO

Novas abordagens clínicas para o diagnóstico e monitoramento de pacientes com doenças sistêmicas têm sido empregadas, através da utilização de fluidos biológicos orais, como a saliva e o fluido gengival crevicular (FGC) (Malamud, 2011). O valor da saliva como fluido para diagnóstico desperta muito interesse pela possibilidade de ser coletada de forma não invasiva, particularmente quando comparada às punções venosas e biópsias (Mitterhofer et al., 2012b).

Por ser facilmente coletada e armazenada, a saliva é ideal para a detecção precoce de doenças, já que possui marcadores biológicos específicos. Além disso, novas modalidades de coleta de amostras salivares, como o bochecho/lavado bucal, associadas a técnicas biomoleculares, como PCR e ELISA, para a detecção de determinadas proteínas, têm mostrado resultados tão específicos e sensíveis quanto os resultados obtidos por meio de amostras de sangue e urina (Johnson et al., 2011; Giannobile et al., 2011; Malamud, 2011; Mitterhofer et al., 2012b; Fatahzadeh et al., 2013).

O FGC é um biofluido intersticial ou um transudato inflamatório, eliminado via sulco gengival, que contém anticorpos séricos, particularmente a globulina G, citocinas e uma série de outros produtos inflamatórios, sejam eles produzidos nos tecidos periodontais inflamados ou advindos da circulação sanguínea. Com isso, o FGC pode ser uma boa alternativa no diagnóstico de doenças sistêmicas (Johnson et al., 2011).

Os humanos são hospedeiros naturais para o poliomavírus humano BK (BKV) e JC (JCV). O BKV e o JCV são vírus não patogênicos para indivíduos imunocompetentes e sua ativação está associada à imunodeficiência do hospedeiro (Hirsch; Steiger, 2003; Machado et al., 2011).

O BKV infecta aproximadamente 90% da população geral (Hirsch; Steiger, 2003). Este poliomavírus está geralmente relacionado com doenças no trato urinário, como a cistite hemorrágica em transplantados de medula óssea e nefrite intersticial em transplantados renais. No caso de imunossupressão mediada por células, ocorre um aumento da replicação do BKV e indução de reação inflamatória (Hirsch et al., 2002). Uma das doenças causadas pela replicação do BKV é a nefropatia associada ao poliomavírus (NAP), caracterizada pela disfunção e perda do próprio rim ou do rim transplantado (Amir et al., 2011).

O JCV afeta assintomaticamente até 70% dos adultos saudáveis e mantém-se latente no tecido renal. Em caso de imunossupressão do hospedeiro, o JCV pode infectar os oligodendrócitos, causando uma desmielinização, conhecida como leucoencefalopatia multifocal progressiva (LMP). A LMP é uma doença rara, geralmente fatal, que ocorre quase exclusivamente em pacientes severamente imunossuprimidos, como indivíduos HIV positivos, com doenças hematológicas malignas, neoplasias de órgãos sólidos, transplantados de órgãos ou pessoas que estejam recebendo tratamento imunossupressor (Delbue et al., 2013).

Como ambos poliomavírus, BKV e JCV, permanecem latentes no tecido renal e estão relacionados à imunossupressão, pacientes com insuficiência renal crônica (IRC) e transplantados renais (TR) são grupos nos quais a análise e diagnóstico precoce desses vírus são interessantes, afim de prevenir a evolução da infecção viral e as subsequentes doenças relacionadas a eles.

O diagnóstico precoce e a redução da imunossupressão são os únicos métodos de controle e tratamento da infecção causada pelo BKV e JCV. Métodos não invasivos para o rastreamento, podem facilitar a detecção de novos casos e a monitoração de casos previamente conhecidos.

Nossa hipótese é a de que os fluidos orais sejam úteis na detecção do BKV e do JCV e que pessoas imunossuprimidas apresentem o vírus com mais frequência que os saudáveis. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi verificar a possibilidade de detecção e quantificação do BKV e JCV em saliva, lavado bucal e FGC de indivíduos com IRC, TR e controles, e comparar os achados com os encontrados em amostras de sangue e a urina, tradicionalmente usados nesse rastreamento.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FLUIDOS ORAIS E DIAGNÓSTICO

Novas abordagens clínicas para o diagnóstico e monitoramento de pacientes com doenças sistêmicas têm sido empregadas, através da utilização de fluidos orais, como a saliva, lavado bucal e o fluido gengival crevicular (FGC) (Malamud, 2011). O valor da saliva como fluido para diagnóstico desperta muito interesse pela possibilidade de ser coletada de forma não invasiva, particularmente quando comparada às punções venosas e biópsias, além do seu armazenamento e manuseio serem mais seguros (Mitterhofer et al., 2012b). Além disso, a saliva possui marcadores biológicos específicos, ideais para a detecção e acompanhamento de diversas doenças (Johnson et al., 2011; Giannobile et al., 2011; Malamud, 2011; Mitterhofer et al., 2012b; Fatahzadeh et al., 2013).

A composição molecular da saliva inclui moléculas imunológicas, hormonais e toxicológicas que podem oferecer informações vitais da saúde sistêmica. A saliva tem sido utilizada informalmente como auxiliar no diagnóstico clínico por mais de 2000 anos. Historicamente, a viscosidade e o odor da saliva eram utilizados como diagnóstico para doenças como a diabetes mellitus, a insuficiência renal e a insuficiência hepática (Priyanka et al., 2012).

Os componentes sorológicos da saliva são derivados, principalmente da vascularização local que se origina nas artérias carótidas, por isso são encontradas muitas moléculas da circulação sistêmica. Além disso, contém quantidades suficientes de biomarcadores de doenças, ácido ribonucleico (RNA) e ácido desoxirribonucleico (DNA), tornando a saliva um fluido de potencial valor e uma excelente alternativa no processo de diagnóstico de várias doenças sistêmicas (Priyanka et al., 2012).

Os avanços nas técnicas de análise salivar já conseguiram desvendar muitas das associações entre proteínas presentes na saliva e doenças sistêmicas (Priyanka et al., 2012). Em algumas infecções, como por papilomavírus ou herpes vírus, se utiliza a detecção de imunoglobulinas (IgM e IgG) para distinguir as doenças crônicas das doenças agudas, já que a detecção apenas dos anticorpos não indica se a infecção está latente ou ocorreu somente no passado (Corstjens et

al., 2012). Apesar dos avanços nas pesquisas envolvendo testes salivares, estes ainda constituem uma minoria nos testes diagnósticos que são realizados (Corstjens et al., 2012).

A saliva total é a mais frequentemente utilizada devido à sua coleta ser simples, rápida, não invasiva e sem a necessidade de equipamentos específicos. Pode ser coletada com ou sem estímulo. A saliva total não estimulada é comumente coletada através do método de drenagem, em que o indivíduo inclina a sua cabeça um pouco para frente para que a saliva escorra para a região anterior da boca e seja captada em um recipiente estéril. A saliva não estimulada é a mais adequada e mais utilizada para diagnóstico, já que não há alteração do pH ou diluição da concentração das proteínas da saliva, causadas pelos métodos de estímulo (Priyanka et al., 2012).

Por não coagular, como o sangue, a saliva é mais fácil de ser manuseada durante os procedimentos de diagnóstico. Sua coleta também apresenta um menor potencial para transmissão de doenças infecciosas, em casos de acidentes perfurocortantes, quando comparada à coleta de sangue (Priyanka et al., 2012).

Outras modalidades de coleta de amostras salivares, como o bochecho/lavado bucal, associadas a técnicas biomoleculares, como PCR e ELISA, para a detecção de determinadas proteínas, têm mostrado resultados tão específicos e sensíveis quanto os resultados obtidos por meio de amostras de sangue e urina, para a detecção de anticorpos anti-HIV, antívirus da hepatite e do sarampo, hormônios, glicemia e DNA (Johnson et al., 2011; Giannobile et al., 2011; Malamud, 2011; Mitterhofer et al., 2012b; Fatahzadeh et al., 2013).

Um grupo de pesquisadores analisou diversas marcas comerciais de bochechos com relação à sua efetividade em exames diagnósticos e considerou o Listerine® eficaz para a quantificação de DNA através do PCR em amostras de lavado bucal, permitindo boa quantidade de amplificação do DNA (Heath et al., 2001). O teste PCR real-time quantitativo é reconhecido por sua capacidade de enumerar pequenos números de genomas virais que estão presente em grandes quantidades de DNA não associado (Pal et al., 2006).

O FGC é um biofluido intersticial ou um transudato inflamatório, eliminado via sulco gengival, que traz anticorpos séricos, particularmente a globulina G, citocinas e uma série de outros produtos inflamatórios, sejam eles produzidos nos tecidos periodontais inflamados ou advindos da circulação sistêmica. Além disso, o FGC

contém células (descamado epitelial, neutrófilos, linfócitos, monócitos e patógenos), além de eletrólitos e componentes orgânicos semelhante ao plasma (potássio, cálcio, albumina, globulinas, inibidores de protease, lactato, ureia e múltiplas enzimas) (Johnson et al., 2011). O FGC tem um papel protetor na cavidade oral por remover com eficácia, células prejudiciais, moléculas e patógenos, além de ter um papel antibacteriano, em virtude de seus neutralizadores de patógenos (Malamud, 2011).

Pollock et al., 1984, demonstraram que o antígeno de superfície para hepatite B (anti-HBsAg) foi facilmente quantificado no FGC de indivíduos com hepatite B. Klemenc et al., 2005, encontraram maior prevalência de EBV e HHV-6 no FGC de indivíduos com periodontite, demonstrando a relação entre o herpes vírus e a periodontite agressiva.

O maior desafio de utilizar o FGC como fluido de diagnóstico é a análise do pequeno volume coletado e da necessidade de treinamento individual para a coleta da amostra (Johnson et al., 2011). Apesar dos marcadores encontrados na saliva e no FGC serem similares, a coleta de saliva é mais vantajosa por ser mais simples de coletar e armazenar, ser mais barata e por ter mais quantidade de volume de amostra (Priyanka et al., 2012). Até o presente momento, poucos trabalhos demonstraram a detecção dos poliomavírus humano BK (BKV) e JC (JCV) em amostras salivares (Jeffers et al., 2009; Robaina et al., 2013a; Robaina et al., 2013b; Burger-Calderon et al., 2014) e nenhum trabalho procurou sua presença em FGC.

2.2 POLIOMAVÍRUS HUMANO BK E JC

Os poliomavírus são pequenos vírus, não envelopados com dupla-fita de DNA e foram acidentalmente descobertos por volta de 1950, causando infecções transmissíveis que originavam múltiplos tumores em roedores, por isso a nomenclatura POLI (múltiplo) – OMA (câncer) (Hirsch; Steiger, 2003). Os dois primeiros poliomavírus descobertos em humanos foram os poliomavírus humano BK (BKV) e JC (JCV), nomeados com as iniciais dos pacientes dos quais os vírus foram isolados por volta da década de 70 (Gardner et al., 1971; Padget et al., 1971).

O BKV e o JCV são vírus não patogênicos para indivíduos imunocompetentes e sua ativação está associada à imunodeficiência do hospedeiro

(Hirsch; Steiger, 2003; Machado et al., 2011). Os poliomavírus também podem promover a transformação oncogênica de vários tipos de células. O DNA do BKV e JCV foram detectados em vários tipos de tumores em humanos (Flaegstad et al., 1999). Apesar disso, não há nenhuma prova concreta de que os poliomavírus estejam diretamente associados a causa de câncer em humanos ou atuando como cofator na patogênese de algum tipo de câncer humano (Fioriti et al., 2005).

As infecções primárias, tanto do BKV quanto do JCV ocorrem geralmente durante a infância, de maneira subclínica, seguidas da persistência do vírus no hospedeiro. Cerca de 60% dos casos, podem ser acompanhadas por sintomas respiratórios ou doenças do trato urinário (Fioriti et al., 2005; Goudsmit et al., 1982). Em um estudo prospectivo, foram analisadas 66 crianças saudáveis apresentando problemas respiratórios, 11 delas soro-converteram para o BKV. Dessas, 7 (63,6%) apresentaram doença respiratória moderada, enquanto 4 (36,4%) eram assintomáticas (Goudsmit et al., 1982). A via de contaminação e o mecanismo do vírus para entrar no estado de latência ou manter baixos os níveis de expressão gênica ou replicação, não estão totalmente estabelecidos (Ling et al., 2003; Vanchiere et al., 2009; Robaina et al., 2013a).

O aumento na incidência da detecção do poliomavírus na urina (viruria) e sua detecção no sangue (viremia) foi constatada em pacientes receptores de células tronco hematopoiéticas, rim e coração, e em indivíduos infectados pelo HIV (Eash et al., 2006).

O BKV infecta aproximadamente 90% da população geral (Hirsch; Steiger, 2003). Este poliomavírus está geralmente relacionado com doenças no trato urinário, como a cistite hemorrágica em transplantados de medula óssea e nefrite intersticial em transplantados renais. A partir dos anos 90, houve um crescimento significativo na incidência e nas complicações do BKV em transplantados renais, devido ao aumento no número de transplantes renais e à utilização de novas e mais potentes drogas imunossupressoras, principalmente o Tacrolimus e o Micofenolato Mofetil. As complicações decorrentes do BKV caracterizam-se por nefropatia associada tanto com a disfunção do órgão transplantado quanto com a perda prematura do mesmo (Hirsch, 2002; Drachenberg et al., 2007; Kumar, 2010).

A infecção primária pelo BKV ocorre geralmente durante a infância e de maneira subclínica. Mas, em aproximadamente 60% dos casos, pode desenvolver sintomas como cistite, nefrite, problemas respiratórios e até mesmo encefalite

(Goudsmit et al., 1982). A infecção evolui para um estado de latência em vários tecidos, mas com o trato urogenital como principal local (Hirsch; Steiger, 2003). Em situação de imunossupressão, a reativação e o aumento da replicação pode ocorrer, com a consequente indução da chegada de células inflamatórias (Hirsch et al., 2002).

A infecção pelo BKV indica a exposição sorológica e virológica do vírus, mas não distingue entre replicação viral e latência. A replicação do BKV é definida pela multiplicação viral por detecção das unidades infecciosas do BKV (células em cultura, virions pela microscopia eletrônica, proteínas estruturais específicas, expressão de RNA-m dos genes finais, DNA genômico em modo de replicação ou em locais de não latência, ou evidência histológica ou citológica da replicação). A infecção primária é diagnosticada pela detecção de genes virais em um indivíduo soronegativo. A infecção secundária é definida com a replicação do BKV em um indivíduo previamente soropositivo. A reativação ou reinfecção é considerada se a replicação do latente ou de um novo subtipo for detectada, respectivamente. Já a doença pelo BKV é considerada quando a replicação viral está causando a disfunção do órgão (presença da replicação do BKV no tecido patológico) (Hirsch; Steiger, 2003).

O BKV tem sido associado com diversas condições tais como a cistite hemorrágica, estenose uretérica, vasculopatia, pneumonia, encefalite, retinite, doenças auto imunes e até mesmo falência múltipla dos órgãos (Hirsch; Steiger, 2003). Uma das doenças causadas pela replicação do BKV é a nefropatia associada ao poliomavírus (NAP), caracterizada pela disfunção e perda do próprio rim ou do rim transplantado. Esta condição foi descrita primeiramente em 1995 por Purighalla et al. e vem sendo considerada uma importante causa da perda do órgão em pacientes transplantados renais.

A NAP ocorre em torno de 1 a 5% dos receptores de transplante renal e está associada a perda do transplante em até 50% desses casos (Mayr et al., 2001; Hirsch et al., 2002). Oitenta por cento dos adultos que desenvolvem NAP são soropositivos para o BKV antes do transplante (Hirsch; Steiger, 2003) e a maioria das vezes a reativação viral ocorre no primeiro ano pós-transplante (Kumar, 2010; Hirsch; Steiger, 2003).

Os métodos laboratoriais rotineiramente utilizados para pesquisar a replicação do BKV incluem a citologia de amostras de urina, em que são

observadas inclusões virais nas células descamadas e o PCR em amostras de urina e sangue. Esses métodos de *screening* têm possibilitado o diagnóstico precoce da NAP, aumentando a taxa de sucesso no tratamento destes casos (Hirsch; Steiger, 2003).

O diagnóstico definitivo da NAP é feito através de biópsia do rim, exame padrão-ouro, que oferece alta especificidade, ao demonstrar inclusões virais intranucleares com vários níveis de inflamação nos tecidos renais, mostrando a replicação do vírus associada a sinais de rejeição do órgão enxertado (Hirsch et al., 2002). Entretanto, a sensibilidade deste exame é limitada, devido ao padrão focal da NAP, o que pode levar à coleta de amostras não representativas e de resultados falsos-negativos (Kumar, 2010). Métodos de *screening* para detecção do vírus podem induzir o diagnóstico precoce da infecção, resultando em menores índices de perda do enxerto, já que facilitariam o acompanhamento da carga viral no paciente (Hu et al., 2011; Huang et al., 2013)

A rota de transmissão do BKV ainda não está totalmente esclarecida. Uma das hipóteses aceitas é a de que a infecção primária ocorresse no trato respiratório. A transmissão via transplacentária também tem sido proposta, baseada na detecção de IgM no cordão umbilical e do DNA do BKV em tecidos fetais e placentários (Hirsch; Steiger, 2003). Além disso, esse vírus pode ser transmitido através do próprio órgão transplantado (Fioriti et al., 2005). Vanchiere et al., 2009 relataram a presença do BKV e JCV em espécimes de fezes em adultos saudáveis mostrando que ambos persistem no trato gastrointestinal, sugerindo a transmissão fecal-oral como uma possível e importante rota de disseminação.

Jeffers et al., 2009, demonstraram a presença do BKV na saliva, através do PCR tempo real quantitativo e a replicação nas células das glândulas salivares em cultura. O estudo de Jeffers et al., 2009 foi o primeiro a detectar o BKV em saliva de pacientes com HIV e indivíduos saudáveis, evidenciando que as células salivares humanas podem estar infectadas e serem local de latência, além dos rins e trato urogenital. Esse estudo também sugere a possibilidade da transmissão por via oral do vírus.

Robaina et al., 2013a, avaliaram a presença dos poliomavírus na saliva de crianças infectadas pelo vírus HIV e observaram a presença do DNA dos poliomavírus BK, JC, WU e KI nas amostras de saliva de crianças tanto HIV

positivas quanto do grupo controle, com a frequência de infecção significativamente maior no grupo de crianças HIV positivas.

Apesar de alguns trabalhos demonstrarem a detecção do BKV e JCV na saliva, nenhum trabalho até o presente momento, demonstrou sua presença no FGC (Jeffers et al., 2009; Robaina et al., 2013a; Robaina et al., 2013b; Burger-Calderon et al., 2014).

Acredita-se que em transplantados renais, a viremia do BKV seja precursora da NAP, precedendo a nefropatia entre 1 a 12 semanas. Geralmente a NAP ocorre em média no período entre 9 a 12 meses após o transplante, mas alguns casos foram reportados com apenas 7 dias após o transplante (Hirsch; Steiger, 2003).

Ainda não há terapia anti-viral eficaz para o controle e redução da replicação do BKV. O controle é feito através da redução do tratamento imunossupressor, o que por outro lado, eleva as chances de rejeição do órgão transplantado (Hirsch et al., 2002).

Alguns trabalhos sugerem a utilização do Cidofovir, mas sempre em associação com a redução na imunossupressão (Hirsch; Steiger, 2003). Além disso, o Cidofovir é excretado por via renal e acumula nas células tubulares renais, sendo portanto nefrotóxica. A redução de imunossupressores pode ser a troca para um regime de baixa dose de ciclosporina e a substituição do micofenolato mofetil pela azatioprina. Essa alteração pode permitir ao sistema imune recuperar o controle sobre a doença viral. A baixa dose de imunossupressores deve ser mantida até que se consiga a depuração viral. Entretanto, a duração deve ser a mais curta possível para reduzir o risco de episódios de rejeição (Mayr et al., 2001).

No caso do transplantado renal ser previamente positivo ou receber o rim de um doador positivo, a reativação pelo BKV ocorre nas células tubulares epiteliais do rim do doador que pode ser amplificada para a camada de células uroteliais. O retransplante após uma NAP pode ser realizado com sucesso, apesar de a recorrência já ter sido reportada. Devido ao aumento na incidência do BKV nos receptores de transplantes renais atualmente, é recomendado analisar periodicamente amostras de sangue e urina, destes indivíduos, para verificar a ativação do BKV, principalmente durante o primeiro ano após o transplante (Hirsch; Steiger, 2003).

O BKV é parecido ao JCV, com mais de 70% de homologia de ácidos nucléicos (Drachenberg et al., 2007; Hirsch; Steiger, 2003). O JCV é encontrado na

forma latente, em tecido renal em aproximadamente 70% dos adultos saudáveis. Em caso de imunossupressão do hospedeiro, o JCV pode infectar os oligodendrócitos, levando à desmielinização progressiva no sistema nervoso central, condição conhecida como leucoencefalopatia multifocal progressiva (LMP) (Hirsch et al., 2013b; Delbue et al., 2013).

O JCV foi primeiramente descrito por Padgett et al 1971 que isolou o vírus do cérebro de um paciente, cujo nome tinha as iniciais JC, com linfoma de Hodgkin e que morreu em decorrência da LMP. O JCV não infecta outras espécies além da humana e tem tropismo para se replicar nas células gliais, células epiteliais renais e com menor eficiência nos linfócitos B e células do sistema nervoso central (Delbue et al., 2013).

A LMP é uma doença rara, geralmente fatal, que ocorre quase exclusivamente em pacientes severamente imunossuprimidos, como indivíduos HIV positivos, com doenças hematológicas malignas, neoplasias de órgãos sólidos, transplantados de órgãos ou recebendo tratamento imunossupressor. Os principais sintomas da LMP são deficiências motoras, alterações de consciência, comprometimento da marcha e distúrbios visuais (Delbue et al., 2013).

O JCV também apresenta potencial para causar doença renal, porém, menos frequentemente que o BKV. Casos isolados de nefrite em rins de pacientes com LMP foram reportados (Dorries; Meulen, 1983).

A alta frequência do JCV excretado na urina sugere que os rins sejam um local de latência deste vírus. Mas outros reservatórios estão sendo investigados. A hibridização in situ já demonstrou a presença de JCV em linfócitos B, medula óssea e outros tecidos retículo-endoteliais, como pulmões, linfonodos e tonsilas. A presença do DNA do JCV no tecido tonsilar e a frequência com que este vírus é disseminado pelas vias respiratórias, sugerem que o JCV possa ser transmitido por essa via (Berger et al., 2006; Jeffers et al., 2009; Robaina et al., 2013b).

Ling et al., 2003 , após estudar a reativação e eliminação dos poliomavírus em 30 indivíduos saudáveis por mais de 14 meses, constatou que a eliminação do JCV na urina foi idade dependente nos indivíduos saudáveis, ocorrendo com maior frequência nos indivíduos com mais de 40 anos. Também demonstrou que a eliminação do JCV na urina foi mais frequente nas estações de primavera e outono, mostrando que a variação sazonal da reativação do vírus pode influenciar no resultado das coletas.

2.3 INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA E TRANSPLANTE RENAL

A insuficiência renal crônica (IRC) é caracterizada pela perda da capacidade de filtração dos néfrons. Apresenta curso progressivo, culminando com a insuficiência renal terminal, mesmo se a causa inicial da nefropatia cessar (Tomás et al., 2008). Os rins perdem a habilidade de executar suas funções excretórias, endócrinas e metabólicas, levando o paciente à uremia que desencadeia alterações cardiovasculares, hematológicas, neuromusculares, endócrinas, gastrointestinais e dermatológicas (Little et al., 2009)

As principais causas que levam à IRC são diabetes mellitus, hipertensão e glomerulonefrite crônica. Outras causas comuns são a doença renal policística, lúpus eritematoso sistêmico e nefropatia causada pela evolução da infecção pelo HIV. Algumas desordens congênitas também podem levar a IRC, como a amiloidose e a hiperlipidemia (Proctor et al., 2005). A incidência da IRC aumenta com a idade e homens são mais afetados que mulheres (Proctor et al., 2005; Westervelt et al., 2013).

Com o diagnóstico de IRC, o tratamento se baseia em retardar a progressão da doença, evitar as manifestações clínicas e preservar a qualidade de vida do paciente. Abordagens conservadoras são realizadas previamente ao transplante renal, para reduzir a retenção de compostos nitrogenados e controlar a hipertensão (Little et al., 2009).

Nos indivíduos com IRC, quando a taxa de filtração glomerular (TFG) atinge o nível menor que 15ml/min é necessário iniciar uma terapia de substituição renal para evitar sérias complicações que possam levar o paciente à morte (Tomás et al., 2008). A diálise é um procedimento capaz de filtrar artificialmente o sangue, utilizada no tratamento da IRC em estágio terminal. Pode ser realizada através da diálise peritoneal ou hemodiálise (Tokars et al., 2000; Kho et al., 1999; Tomás et al., 2008).

A diálise peritoneal pode ser cíclica contínua (DPCC) ou ambulatorial contínua (DPAC). Ambas fazem uso de um cateter peritoneal permanente para infundir uma solução hipertônica na cavidade peritoneal e remover os solutos dissolvidos, como a ureia. Na DPCC a máquina realiza o procedimento a noite, enquanto o paciente dorme e na DPAC são procedimentos manuais, mais curtos e várias vezes ao dia (Tokars et al., 2000).

A hemodiálise é o tratamento dialítico mais utilizado. É realizado a cada 2 dias por um período de 3 a 4 horas, através de uma fístula arteriovenosa permanente colocada no antebraço do paciente ou através de um cateter central localizado próximo ao pescoço (Tokars et al., 2000).

Tanto a diálise peritoneal quanto a hemodiálise podem deprimir o sistema imune de pacientes em tratamento para IRC. Na diálise peritoneal, o paciente perde continuamente macrófagos peritoneais e proteínas, incluindo imunoglobulinas, o que leva a alterações no sistema humoral e celular de defesa, diminuindo a resposta imunológica frente a infecções. O contato do sangue com a membrana da hemodiálise pode levar a degeneração dos leucócitos e causar a ativação do sistema complemento (Tokars et al., 2000). Essas alterações imunológicas em pacientes em diálise podem predispor infecções virais oportunistas, como o BKV e o JCV (Mitterhofer et al., 2012a).

Alguns estudos mostraram a detecção do BKV e JCV em pacientes com IRC. Mitterhofer et al., 2012a selecionaram 58 pacientes com IRC, em terapia dialítica e avaliaram a replicação do BKV no plasma e urina de pacientes com diurese preservada. A prevalência da infecção pelo BKV no sangue foi de 33% (12 de 36) nos pacientes em hemodiálise e 0% nos pacientes em diálise peritoneal. Na urina, todos os pacientes em hemodiálise apresentaram presença do vírus e 14% dos pacientes em diálise peritoneal tiveram resultados positivos.

Em outro trabalho, os mesmos autores avaliaram 31 pacientes com insuficiência hepática, a espera para o transplante de fígado. Dividiram os pacientes em dois grupos, baseando-se na presença ou não de insuficiência renal associada. Compararam a presença do BKV na urina e sangue dos indivíduos dos dois grupos e constataram que a presença do vírus no grupo sem insuficiência renal associada foi de 14%, enquanto 56% dos indivíduos do grupo com insuficiência renal associada apresentaram o BKV no plasma (Mitterhofer et al., 2012b).

Apesar dos estudos detectarem o BKV e o JCV, principalmente na urina, pacientes com IRC em estágio terminal em tratamento com diálise não eliminam ou eliminam um volume muito reduzido desse fluido, sendo este um fator limitante para o *screening* por meio da análise da urina. Além disso, a excreção de altos níveis de ureia nesses pacientes pode ser um inibidor importante na reação de PCR, já que ocorre inibição da amplificação dos segmentos da sequência do BKV (Pires et al., 2011; Dranchenberg et al., 2007).

Walt et al. (2007) e Arregger et al. (2008) reportaram uma série de marcadores salivares que foram associados a doença renal em estágio final. A lista dos marcadores incluem cortisol, nitrito, ácido úrico, sódio, cloreto, pH, amilase e lactoferrina. Em um estudo subsequente feito pelos mesmos pesquisadores, testes com tiras colorimétricas foram utilizadas para monitorar na saliva o nitrato e o ácido úrico antes e depois da hemodiálise. Foi sugerido que o teste salivar pode ser utilizado pelos próprios pacientes para decidir quando é necessário realizar a diálise e com isso, eliminar visitas desnecessárias à clínica de diálise (Blicharz et al., 2008). Além disso, a avaliação dos níveis de fosfato na saliva estão positivamente correlacionados com os níveis de creatinina e da taxa de filtração glomerular (Malamud, 2011).

Indivíduos com IRC apresentam maior prevalência de doença periodontal quando comparados a indivíduos saudáveis. Essa alteração estaria relacionada principalmente aos componentes inflamatórios advindos da própria doença renal (Ioannidou et al., 2011). Além disso, medicações utilizadas tanto por indivíduos com IRC como por transplantados renais, como anti-hipertensivos bloqueadores de canais de cálcio ou imunossupressores como a ciclosporina, podem induzir o crescimento gengival, contribuindo com a formação de bolsas periodontais e com a evolução da doença periodontal (Proctor et al., 2005)

Tem-se recomendado a detecção e o monitoramento do BKV e do JCV em sangue e urina de candidatos a transplante renal, através da quantificação das células de DNA desses poliomavírus com o PCR, especialmente devido ao potencial dado ao papel desses vírus na rejeição do enxerto (Pires et al., 2011). Mas até o momento, nenhum autor sugeriu esse monitoramento através de fluidos orais.

Pacientes transplantados renais são mais suscetíveis a apresentarem infecção pelos poliomavírus quando comparados a transplantados de outros órgãos, devido à injúria do órgão por toxicidade das drogas imunossupressoras, aos episódios de rejeição, às isquemias e às incompatibilidades dos doadores (Yin et al., 2010).

O BKV infecta preferencialmente os transplantes renais, mas casos infectando outros transplantes de órgãos sólidos também já foram descritos. Essa preferência pelos rins se dá por uma série de fatores incluindo o microambiente imune do enxerto que permite o processamento e a apresentação do antígeno em locais com defeito (Kumar, 2010).

Westervelt et al., 2013, avaliaram retrospectivamente 347 pacientes que receberam transplante renal e compararam a capacidade de diagnóstico e o desempenho no *screening* da presença do BKV na urina e sangue. Dos 347, 69 apresentaram positividade para o BKV, sendo que 29 foram submetidos a biópsia renal e 11 foram diagnosticados com nefropatia associada ao BKV. Os índices de sensibilidade desse estudo para urina e plasma foram de 88% e 100% respectivamente. Com isso, os autores concluem que as análises de urina e sangue funcionam como teste de controle para a infecção do BKV e diagnóstico da NAP.

Em um estudo prospectivo de Hu et al., 2011, 50 indivíduos no pós-transplantes foram avaliados através da coleta de sangue e urina e comparados com 20 indivíduos saudáveis. Os poliomavírus foram encontrados em 46% dos indivíduos no pós-transplante, sendo o JCV em maior frequência (42%) do que o BKV (4%), enquanto a detecção dos poliomavírus foi detectada em apenas 10% dos indivíduos saudáveis. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a taxa de filtração glomerular e a presença do vírus.

Após o aparecimento de drogas imunossupressoras altamente potentes, como o Micofenolato Mofetil e o Tacrolimus, a NAP tornou-se mais comum (Kumar, 2010). O Micofenolato mofetil é indicado para evitar a rejeição de transplantes após transplantes renais, cardíacos e de fígado e para tratamento de diversas doenças auto-imunes como a miastenia gravis (Chahin; Berger, 2014). A estratégia da redução da imunodepressão tem mostrado benefícios na redução da incidência do BKV associado a nefropatia (Kumar, 2010).

O diagnóstico precoce e a redução da imunossupressão são os métodos de maior eficácia no controle e tratamento da infecção causada pelo BKV e JCV. Métodos não invasivos para o *screening*, podem facilitar a detecção de novos casos e o monitoramento de casos previamente conhecidos (Kumar, 2010).

Nossa hipótese é que encontremos BKV e JCV nos fluidos orais e que a presença de doença periodontal possa ter relação com maior positividade dos vírus no fluido gengival crevicular. Também acreditamos que haja uma correspondência positiva entre detecção de fluidos orais e urina. Além disso acreditamos que indivíduos imunossuprimidos, tanto os IRC como os TR, apresentem mais frequência de amostras positivas para os poliomavírus estudados.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo principal deste estudo foi avaliar a detecção e quantificação dos poliomavírus humano BK e JC na saliva, lavado bucal e fluído gengival crevicular em indivíduos com insuficiência renal crônica em terapia dialítica, em transplantados renais e em indivíduos saudáveis.

Como objetivos secundários pretendíamos conhecer a frequência de positividade para BK e JC das populações estudadas, e comparar qualitativa e quantitativamente os achados nos fluidos bucais entre si, bem como com os encontrados em soro e urina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Foram incluídos 38 indivíduos atendidos no Centro de Atendimento a Pacientes Especiais da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (CAPE-FOUSP), divididos em 3 grupos: grupo com insuficiência renal (GIR) composto por 14 indivíduos com IRC em terapia dialítica; grupo transplantado renal (GTR) formado por 12 indivíduos transplantados renais; grupo controle (GC) composto por 12 indivíduos sem quaisquer alterações sistêmicas relacionadas à doença renal e imunossupressão. Destes sujeitos foram obtidas 283 amostras de saliva, lavado bucal, fluido crevicular, urina e sangue (Figura 4.1).

Figura 4.1: 38 sujeitos divididos em 3 grupos e amostras coletadas em cada um dos grupos

14 sujeitos Insuficiência Renal Crônica	12 sujeitos Transplantados Renais	12 sujeitos Saudáveis
Grupo Insuficiente Renal (GIR)	Grupo Transplantado Renal (GTR)	Grupo Controle (GC)
56 amostras de FGC, 14 de saliva, 14 de lavado, 12 de sangue.	47 amostras de FGC, 12 de saliva, 12 de lavado, 11 de sangue, 11 de urina.	48 amostras de FGC, 12 de saliva, 12 de lavado, 12 de sangue, 10 de urina.

Os sujeitos deste estudo são parte de uma amostra de conveniência, já que são pacientes que procuraram o CAPE para tratamento odontológico ou que vieram acompanhar seu familiar durante o tratamento odontológico e foram convidados a participar da pesquisa. Foram incluídos no GIR, pacientes diagnosticados com IRC e que realizavam terapia dialítica. Pacientes que realizaram o transplante renal sem sucesso e voltaram para o tratamento de diálise também foram incluídos no GIR. Sujeitos que haviam realizado transplante renal com sucesso foram incluídos no

GTR. E indivíduos saudáveis, sem quaisquer alterações sistêmicas relacionadas à doença renal ou a imunossupressão foram incluídos no GC. Sujeitos com IRC, mas que não estavam em tratamento dialítico e transplantados multivisceral (três ou mais órgãos) foram excluídos do estudo.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Atendimento às normas de bioética

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (CEP-FOUSP). Número CAAE 15042613.6.0000.0075; número do parecer 317.638; aprovado em Junho de 2013 (Anexo A).

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B) foi aplicado a todos os indivíduos que aceitaram participar da pesquisa, antes do início das coletas.

Este projeto de pesquisa obteve o apoio financeiro do CNPQ Edital Universal nº 455173/2014-1.

4.2.2 Anamnese

Um questionário com a história médica pregressa do paciente foi preenchido pelo pesquisador através de informações obtidas pelo prontuário e questionamento direto ao paciente. Dados demográficos (gênero e idade), hábitos (tabagismo), tempo e tipo de diálise, realização de transplantes, tempo decorrido após o transplante, comorbidades associadas, medicação em uso e história odontológica foram compilados no questionário (Apêndice A). Os resultados estão demonstrados no Apêndice B.

4.2.3 Análise de Doença Periodontal

A condição periodontal dos pacientes foi avaliada através do índice comunitário periodontal (ICP), índice recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS-2005) para a realização do exame periodontal (Pinto, 1992).

Neste índice, os dentes são divididos em sextantes definidos como 18-14, 13-23, 24-28, 38-34, 33-43 e 44-48. Com o auxílio de uma sonda periodontal tipo OMS, são examinados seis pontos em cada dente (face vestibular em região mesial, distal e cervical e a face lingual em região mesial, distal e cervical). É pré-requisito de cada sextante a presença de dois ou mais dentes sem indicação de extração, caso contrário o sextante é descartado. Os códigos numéricos utilizados no ICP são: 0 (zero) para sextante hígido; 1 (um) para sextante com sangramento (observado diretamente ou com espelho, após sondagem); 2 (dois) para presença de cálculo; 3 (três) para bolsa de 4 a 5 milímetros; 4 (quatro) para bolsa de 6 milímetros ou mais.

Após a avaliação de todos os dentes pelo ICP, 4 dentes foram selecionados para a coleta do FGC. Dentes localizados nos 4 diferentes quadrantes e em região posterior foram priorizados. Nos 4 dentes selecionados também foram avaliados o limite esmalte-cimento até a margem gengival (LEC-MG), profundidade clínica de sondagem (PCS), sangramento a sondagem (SS), mobilidade dental e índice de placa (IP).

Para a análise e sondagem dos 4 dentes selecionados para a coleta do FGC, foram utilizadas sondas periodontais tipo OMS individuais e estéreis para cada dente, para que assim, os sítios analisados não pudessem ser contaminados entre si pelo BKV e/ou JCV.

Indivíduos com o índice ICP 3 ou 4 em um dos sextantes analisados eram considerados sujeitos com doença periodontal. Assim como dentes com nível clínico de inserção acima de 4 milímetros.

A doença periodontal foi mensurada com o objetivo de relacioná-la à frequência de detecção do BKV e JCV no fluido gengival crevicular, assim como Klemenc et al., 2005 relacionaram a presença de periodontite agressiva com a presença do herpes vírus.

4.2.4 Coleta da Fluido Gengival Crevicular

Após o exame clínico e análise periodontal, foi realizada a remoção da placa supragengival dos 4 dentes selecionados para a coleta do FGC, com cureta manual. Os dentes foram isolados com rolos de algodão e um sugador de saliva, para evitar o risco de contaminação salivar. Os dentes foram delicadamente secos com jato de ar por 10 segundos. Em cada dente, apenas um sítio foi selecionado para a coleta do FGC.

Foi utilizado um filtro especial para coleta de FGC, o *Periopaper*[®] (Periopaper Collection Strip, Oraflow, Plainview, NY, USA), que foi introduzido no sítio selecionado, sulco gengival/bolsa periodontal onde permaneceu por 30 segundos. Para a análise viral em PCR real time e devido ao reduzido conteúdo da amostra, foram necessárias 2 unidades de *Periopaper*[®] por sítio, coletadas com intervalo de no mínimo 5 minutos entre elas. Foram coletadas 4 amostras de FGC de 4 sítios diferentes de cada paciente. Amostras que por ventura tenham se contaminado com sangue advindo do sulco ou bolsa gengival ou da saliva da cavidade bucal foram descartadas.

Após cada coleta, o *Periopaper*[®] com o FGC coletado foi colocado em um tubo tipo *Ependorf*[®] contendo 1 mL de *Trizol*[®]. Em cada *Ependorf*[®], foram colocados as 2 unidades de *Periopaper*[®] do mesmo sítio do dente selecionado. Durante a coleta, os tubos tipo *Ependorf*[®] contendo o *Trizol*[®] permaneceram refrigerados, dentro de um isopor com gelo e ao final da coleta, foram imediatamente congelados a -20°C.

O *Trizol*[®] (*TRIzol Reagent*[®]) é um reagente pronto para uso e tem a capacidade de isolar com alta qualidade RNA, DNA e proteínas advindas de células e amostras teciduais de humanos, podendo ser utilizado no PCR real time (www.lifetechnologies.com).

4.2.5 Coleta de Saliva

A coleta da saliva total não estimulada foi realizada para a detecção do BKV e JCV. As coletas foram realizadas em sala ventilada e iluminada com os pacientes

sentados confortavelmente e tendo sido orientado a não comer, ingerir líquidos ou usar produtos de higiene bucal por pelo menos uma hora antes da coleta. Foi coletada uma única amostra de cada paciente. O indivíduo permaneceu sentado, com a cabeça ligeiramente inclinada para baixo e foi instruído a desprezar toda a saliva produzida dentro de um tubo coletor milimetrado, estéril, do tipo *Falcon*[®], por no máximo 5 minutos. A saliva relativa ao primeiro minuto foi descartada. A amostra salivar obtida foi imediatamente congelada em freezer a -20° C.

4.2.6 Coleta do Lavado Bucal

A coleta do lavado bucal foi realizada em sala ventilada e iluminada com os pacientes sentados confortavelmente. Foram coletadas uma única amostra de cada paciente do descamado bucal e do conteúdo salivar. Os pacientes foram instruídos a realizar um bochecho com 10 ml de *Listerine*[®] por 30 segundos e depositar esse líquido bochechado em tubo coletor tipo *Falcon*[®] de 50 ml. Esse tubo estéril foi identificado e congelado em freezer a -20° C para posterior análise.

4.2.7 Coleta de Sangue

As amostras de sangue foram coletadas a partir de punções realizadas nas veias mediana, basílica ou cefálica. Sendo que nos indivíduos que apresentavam fistula arteriovenosa, ativa ou inativa, a coleta foi realizada no braço contralateral. O braço foi garroteado 5 centímetros acima do local da coleta e pedido ao paciente fechar a mão. Foi escolhida a veia mais proeminente através da palpação e realizada assepsia local com álcool a 70%. A coleta foi realizada com agulha 25x8 conectada a uma seringa de 5 ml.

O material colhido foi colocado em tubo com ativador de coágulo, homogeneizado e permaneceu em repouso por no mínimo 30 minutos sob refrigeração a 4°C. Em seguida esse tubo contendo o sangue foi centrifugado por 15 minutos a 3.000 rotações por minuto. O soro foi separado do sangue total e colocado em tubos tipo *Ependorf*[®], que foram identificados e congelados em freezer a -20°C.

4.2.8 Coleta de Urina

A coleta de urina foi realizada nos indivíduos do GTR e GC. Foi coletada uma única amostra de urina de cada paciente, de aproximadamente 40 ml. Os indivíduos foram instruídos a eliminar uma amostra de urina em um tubo estéril, específico para coleta. Nos indivíduos do sexo feminino, também foi instruído uma higiene prévia com lenço umedecido antibacteriano da região para evitar a contaminação da amostra.

4.2.9 Procedimentos Laboratoriais

Em todas as amostras, tais como saliva, lavado bucal, FGC, soro e urina dos pacientes, foram realizadas pesquisas de detecção e quantificação do poliomavírus humano dos subtipos BK e JC através do método de PCR em tempo real. Os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Virologia da Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo (IMTSP-USP).

A extração do DNA foi realizada com o kit de extração *QIAamp DNA QIAGEN*. O protocolo escolhido para a reação de PCR em tempo real foi descrito por Pal et al., 2006 que utiliza *primers* e sondas específicas para o gene que codifica o Ag-T dos poliomavírus JC e BK originando um fragmento de 80pb (Tabela 4.1).

As sondas de ambas as reações foram marcadas com FAM (6-carboxyfluorescein) como *reporter* na porção terminal 5' e com TAMRA (6-carboxy-tetramethylrhodamine) como *quencher* na porção 3'.

A reação final foi preparada com 12,5 µl de “*TaqMan Universal PCR Master Mix (2X)*” (*Applied Biosystems*®), 0,5 µl de cada *primer* (10µM), 0,5µl da sonda (5µM) e 6µl de água DEPC. Os parâmetros da reação foram de 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguidos de 45 ciclos (15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C), submetidos em equipamento ABI 7300 (*Applied Systems*®).

Tabela 4.1: Oligonucleotídeos e sonda responsáveis pela amplificação dos fragmentos no sistema de PCR tempo real

	Sequência
<i>Forward</i>	5' GAAACTGAAGACTCTGGACATGGA 3'
<i>Reverse</i>	5'GGCTGAAGTATCTGAGACT TGGG 3
Sonda JCV	AGGATCCCAACACTCTACCCACCTAAAAAGA
Sonda BKV	CAAGCACTGAATCCCAATCACAATGCTC

O protocolo empregado apresenta alta sensibilidade analítica dos testes, com limite de detecção de 1000 cópias/ml do vírus BK e 600 cópias/ml do vírus JC. Além disso, os testes também apresentam especificidade de 100% na identificação do DNA desses vírus.

4.2.10 Análise Estatística

Os participantes foram identificados por um número em ordem de atendimento e separados por grupos (GIR, GTR e GC). Todos os dados dos pacientes foram registrados em uma base de dados própria, feita através do programa Excel. A análise estatística foi realizada através do programa *PASW Statistics*. Testes de Qui-quadrado, Exato de Fischer e ANOVA foram realizados para analisar a possibilidade de associação entre as variáveis.

5 RESULTADOS

No total foram coletadas 283 amostras, sendo 151 de FGC, 38 de saliva, 38 de lavado bucal, 35 de soro e 21 de urina, dos 38 sujeitos que participaram da pesquisa e que foram divididos em 3 grupos: grupo com insuficiência renal (GIR, 14 sujeitos), grupo transplantado renal (GTR, 12 sujeitos) e grupo controle (GC, 12 sujeitos).

Dos 14 sujeitos do GIR, 7 (50%) eram do gênero feminino, com a média de idade de 49 anos ($\pm 11,2$). Dos 12 indivíduos do GTR, 4 (33,3%) eram mulheres, com média de idade de 48 anos ($\pm 7,8$). Dentre os 12 participantes do GC, todos (100%) eram do gênero feminino, com média de idade de 46 anos ($\pm 11,1$). Os grupos foram pareados por idade, não apresentando diferença estatisticamente significativa entre si ($p > 0,05$). Os dados demográficos e iniciais dos participantes estão resumidos na tabela 5.1.

Tabela 5.1: Dados demográficos e iniciais dos sujeitos da pesquisa

Grupo (n total)	Gênero (n/%)	Média de idade (desvio padrão)	Doenças de base para IRC e TR
GIR (14)	Feminino (7/50%)	49 anos (11,2)	Hipertensão (43%) Hereditariedade (22%) Diabetes tipo 2 (14%) Diabetes tipo 1 (7%) Nefrite (7%) Lupus E. sistêmico (7%)
GTR (12)	Feminino (4/33,3%)	48 anos (7,8)	Diabetes tipo 2 (42%) Nefrite (17%) Hipertensão (8%) Diabetes tipo 1 (8%) Infecção urinária (8%) Cálculo renal (8%) Uso indiscriminado de anti-inflamatórios não esteroidais (8%)
GC (12)	Feminino (12/100%)	46 anos (11,1)	

Todos os 14 sujeitos do GIR realizavam tratamento através da hemodiálise. A mediana de tempo de tratamento dialítico nos indivíduos do GIR e GTR foi de 5 anos. Nos indivíduos do GTR, a média de anos pós-transplante foi de 8,9 ($\pm 5,1$).

Dos 14 indivíduos do GIR, todos (100%) foram positivos para o BKV em pelo menos uma das amostras analisadas e 2 (14,3%) positivos para o JCV. Dos 12 indivíduos do GTR, 11 (91,7%) foram positivos para o BKV e 5 (41,7%) positivos

para JCV. Dos 12 indivíduos do GC, 11 (91,7%) foram positivos para o BKV e 6 (50%) positivos para o JCV (Figura 5.1). As tabelas 5.2 e 5.3 mostram o número e porcentagem de indivíduos positivos nos diferentes grupos e nas diferentes amostras com relação ao BKV e JCV respectivamente. Os Apêndices C e D mostram, respectivamente, a positividade e a quantificação da carga viral do BKV e JCV, nos sujeitos da pesquisa, nas diferentes amostras analisadas.

Figura 5.1: Análise de amostras positivas de BKV e JCV nos grupos insuficiente renal (GIR), transplante renal (GTR) e controle (GC).

Como os indivíduos do GIR não apresentavam a diurese preservada, não existiram amostras de urina a serem analisadas, para este grupo. Além disso, em 2 sujeitos desse grupo (#1 e #2) não foi possível realizar a coleta de sangue, devido a dificuldades técnicas para a punção venosa.

Tabela 5.2: Número e porcentagem de indivíduos positivos para o BKV em cada grupo nas diferentes amostras.

Grupo (n total)	BKV				
	Saliva (n/%)	Lavado (n/%)	FGC (n/%)	Soro (n/%)	Urina (n/%)
GIR (14)	7 (50%)	10 (71,4%)	9 (64,2%)	2 (14,2)	x
GTR (12)	6 (50%)	4 (33,3%)	8 (66,6%)	3 (25%)	7(58,3%)
GC (12)	7 (58,3%)	6 (50%)	7 (58,3%)	1 (8,3%)	3 (25%)

Legenda: (x) Não coletado; (FGC) fluido gengival crevicular

Tabela 5.3: Número e porcentagem de indivíduos positivos para o JCV em cada grupo nas diferentes amostras.

Grupo (n total)	JCV				
	Saliva (n/%)	Lavado (n/%)	FGC (n/%)	Soro (n/%)	Urina (n/%)
GIR (14)	2 (14,2%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	x
GTR (12)	1 (8,3%)	0 (0%)	1 (8,3%)	0 (0%)	4 (36,3%)*
GC (12)	0 (0%)	0 (0%)	3 (25%)	0 (0%)	3 (30%)**

Legenda: (x) Não coletado; (FGC) fluido gengival crevicular; (*) do total de 11 amostras de urina coletadas; (**) do total de 10 amostras de urina coletadas

Com relação à quantificação do JCV, das 15 amostras positivas, 8 foram oriundas dos fluidos orais (saliva e fluido gengival crevicular), porém nenhuma delas alcançaram um nível detectável de quantificação, sendo considerados apenas positivas, porém não quantificáveis (POS NQ). As outras 7 amostras positivas para o JCV foram amostras de urina, sendo que apenas em 3 delas foi possível quantificar a carga viral.

Os grupos foram semelhantes entre si com relação à positividade do BKV e JCV em todas as amostras, saliva, lavado bucal, fluido gengival crevicular, soro e urina. Não apresentando diferença estatisticamente significativa ($p>0.05$).

As amostras de saliva e de lavado bucal mostraram-se igualmente eficientes na detecção de BKV, em todos os grupos estudados, embora nem sempre houvesse concordância na positividade ($p=0,75$; $kappa=0,5$) (Tabela 5.4). Também não houve diferença estatisticamente significativa com relação a detecção do BKV

entre as amostras de urina com as amostras de saliva, lavado bucal e fluido gengival (Tabela 5.4, 5.5 e 5.6).

Tabela 5.4: Associação entre a urina e a saliva com relação a detecção do BKV

		Saliva		p-valor (Qui-quadrado)
		Ausência de BKV	Presença de BKV	
Urina	Ausência de BKV	7 (63,6%)	4 (36,4%)	0,27
	Presença de BKV	4 (40%)	6 (60%)	
Kappa		0,23		
Sensibilidade		0.6 (IC95% 0.27-0.86)		
Especificidade		0.6 (IC95% 0.31-0.87)		

Tabela 5.5: Associação entre a urina e o lavado bucal com relação a detecção do BKV

		Lavado Bucal		p-valor (Qui-quadrado)
		Ausência de BKV	Presença de BKV	
Urina	Ausência de BKV	7 (63,6%)	4 (36,4%)	0,39
	Presença de BKV	5 (50%)	5 (50%)	
Kappa		0,13		
Sensibilidade		0.55 (IC95% 0.22-0.84)		
Especificidade		0.58 (IC95% 0.28-0.83)		

Tabela 5.6: Associação entre a urina e o FGC com relação a detecção do BKV

		Fluido gengival crevicular		p-valor (Qui-quadrado)
		Ausência de BKV	Presença de BKV	
Urina	Ausência de BKV	4 (36,4%)	7 (63,6%)	0,86
	Presença de BKV	4 (40%)	6 (60%)	
Kappa		- 0,036		
Sensibilidade		0.46 (IC95% 0.20-0.73)		
Especificidade		0.5 (IC95% 0.17-0.82)		

Não houve relação entre a presença de doença periodontal nos sítios onde foi coletado o FGC com a detecção do BKV e do JCV ($p>0.05$). (Tabela 5.7 e 5.8)

Tabela 5.7: Associação entre presença de doença periodontal nos sítios com presença do BKV em fluido gengival crevicular (FGC)

		Fluido gengival crevicular		p-valor (Qui-quadrado)
		Ausência de BKV	Presença de BKV	
Doença periodontal	Não	7 (35,0%)	13 (65,0%)	0,06
	Sim	7 (38,9%)	11 (61,1%)	
Kappa		- 0,03		

Tabela 5.8: Associação entre presença de doença periodontal nos sítios com presença do JCV em fluido gengival crevicular (FGC).

		Fluido gengival crevicular		p-valor (Teste exato de Fischer)
		Ausência de JCV	Presença de JCV	
Doença periodontal	Não	17 (85,0%)	3 (15,0%)	0,60
	Sim	17 (94,4%)	1 (5,6%)	
Kappa		- 0,09		

Não encontramos relação entre o tempo de realização de hemodiálise e o tempo de pós-transplante com a detecção do BKV ou do JCV, em nenhuma das amostras analisadas (saliva, lavado bucal, fluido gengival crevicular, soro e urina) ($p > 0.05$).

Comparando-se o número de amostras positivas para BKV e JCV de soro e urina com os fluidos orais (saliva, lavado bucal e FGC), constatamos que não houve associação estatisticamente significativa entre elas ($p > 0.05$).

6 DISCUSSÃO

Nossa hipótese de que encontraríamos os poliomavírus BKV e JCV nos fluidos orais foi confirmada por este estudo, revelando inclusive a presença dos poliomavírus no fluido gengival crevicular (FGC). No entanto, a hipótese de que a presença de doença periodontal poderia estar relacionada com maior frequência de detecção viral nesses sítios não foi confirmada.

Outra hipótese negada foi a de que houvesse correspondência positiva entre detecção viral nas diferentes amostras, em especial nos fluidos orais e urina. Nossos resultados não mostraram tal correspondência. Em outras palavras, amostras positivas de urina por vezes eram negativas para saliva, bem como amostras positivas para lavado bucal eram negativas para urina, e assim por diante.

Por fim, acreditávamos que detectaríamos os vírus mais frequentemente nas amostras dos indivíduos imunossuprimidos, tanto os com insuficiência renal crônica (IRC) em hemodiálise como os transplantados renais (TR), em relação ao controle. No entanto, nossos resultados não mostraram diferença na frequência de detecção dos vírus, entre os grupos estudados.

Neste estudo, foi observada alta incidência de detecção com níveis quantificáveis de carga viral nos fluidos orais, principalmente do BKV. Isso demonstra que novas abordagens clínicas para o diagnóstico e de monitoramento de doenças sistêmicas, através da utilização da saliva, do lavado bucal e do FGC são viáveis. Se considerarmos que muitas das pessoas com IRC não apresentam diurese, o uso do lavado ou da saliva podem representar uma alternativa interessante para a detecção dos poliomavirus.

O protocolo empregado no estudo foi descrito por Pal et al., 2006 e padronizado no laboratório de virologia do IMTSP. Esse protocolo foi escolhido porque, além de ser um método quantitativo, utiliza *primers* e sondas complementares ao gene T dos poliomavírus humanos BK e JC, região altamente conservada e precocemente expressa após a infecção da célula. A padronização realizada no laboratório demonstrou alta sensibilidade analítica dos testes, com limite de detecção de 1000 cópias/ml do BKV e 600 cópias/ml do JCV. Os testes demonstraram também, especificidade de 100% na identificação do DNA desses vírus.

Esse foi o primeiro estudo a detectar o BKV e o JCV em FGC, já que até o presente momento nenhum estudo prévio, havia analisado ou investigado a detecção desses vírus por essa via. Apesar da coleta de FGC ser considerada mais elaborada, dispendiosa e necessitar de treinamento prévio, esta modalidade de coleta ainda pode ser considerada simples ao operador e não invasiva ao paciente.

O FGC advém da circulação sistêmica e dos sítios periodontais inflamados. Apesar disso, não encontramos relação entre a detecção dos poliomavírus no FGC com a doença periodontal dos sítios analisados. O fato encontrado em alguns sujeitos da pesquisa, de apresentar carga viral no FGC, mas não em soro pode ser explicado pela multilocularidade da latência do BKV e do JCV ou por uma viremia prévia ou transitória que pôde ser detectada em determinados locais e não em outros.

A detecção e quantificação do BKV e JCV na saliva pode indicar que as glândulas salivares são um dos locais de latência desse vírus, concordando com as observações dos estudo de Jeffers et al., 2009. A coleta de saliva é um procedimento simples e não invasivo, por isso deve ser considerada importante ferramenta no diagnóstico e monitoramento do BKV nos indivíduos imunossuprimidos. A presença do BKV em altas concentrações na saliva, também sugere um alto potencial de transmissão por essa via.

Robaina et al., 2013b avaliaram 291 amostras de saliva em indivíduos imunocompetentes e observou positividade em apenas 7,2% dos indivíduos para o BKV e 0,3% para o JCV, além disso relacionou a positividade aos indivíduos com idade superior a 50 anos. Em um outro estudo, Robaina et al., 2013a analisaram a saliva de 60 crianças HIV positivas e apenas 5% foram positivas para o BKV e 3.3% para JCV. Em nosso estudo, não foi possível correlacionar a idade com a frequência de positividade, devido ao número reduzido de participantes e por essa razão restringimos a faixa etária do estudo aos adultos. Apesar disso, encontramos maior frequência de detecção dos poliomavírus nas amostras dos fluidos orais. 50% (7) dos indivíduos do GIR, 50% (6) do GTR e 58,3% (7) do GC foram positivos para o BKV na saliva. E 14,2% (2) do GIR, 8,3% (1) do GTR e nenhum indivíduo do GC foram positivos para o JCV na saliva. Nossos resultados reforçam a ideia de que a saliva pode ser uma rota de transmissão do BKV e JCV e que a cavidade bucal e as glândulas salivares podem ser um sítio de latência e replicação desses vírus.

Considerando os 38 participantes de nossa pesquisa, dos 3 grupos estudados, 6 exibiram positividade para o BKV nas amostras de FCG e não exibiram positividade nas amostras de lavado ou saliva. Esse fato pode indicar a ocorrência de uma replicação transitória tanto em glândulas salivares como na circulação sistêmica. No entanto, estudos com coletas em diferentes momentos, no mesmo indivíduo, seriam necessários para explicar melhor esse fato.

O lavado bucal tem sido utilizado por alguns autores como um método alternativo para coleta de saliva (Heath et al., 2001; Burger-Calderon et al., 2014). Além de ser mais confortável para o paciente, quando comparado com a coleta de saliva, o lavado bucal permite que a amostra seja composta não apenas por saliva, mas também contenha células epiteliais advindas do descamado bucal. Nossos resultados mostraram alta frequência de detecção e quantificação do BKV nas amostras de lavado bucal. Isso sugere que o lavado bucal também pode ser utilizado como uma boa alternativa na detecção e monitoramento do BKV. Além disso, o uso de uma solução, neste caso o Listerine®, demonstrou ser eficaz na preservação viral para análise através do PCR tempo real, assim como afirmou o estudo de Heath et al., 2001. No entanto, 9 pacientes (do total) exibiram positividade para a saliva e negatividade para lavado. O contrário ocorreu em 8 casos. Dentro deste contexto, a melhor estratégia para a detecção desses poliomavírus seria realizar os dois tipos de coleta, no mesmo indivíduo, pois aumentaríamos a chance de detecção.

Brennan et al., 2005, realizaram um estudo prospectivo randomizado com 200 transplantados renais e concluíram que a alta incidência da virúria (46%) do BKV estava relacionada com o uso concomitante de tacrolimus e micofenolato mofetil e que as menores incidências (13%) estavam relacionadas com o uso de ciclosporina com micofenolato mofetil. Em nosso estudo, 3 (25%) transplantados renais exibiram viremia para o BKV. Mas, por uma limitação de nosso estudo, que analisou um número pequeno de sujeitos transplantados renais (12 participantes), não foi possível avaliar a correlação entre o tipo de medicação imunossupressora com a replicação viral. Entre os 3 transplantados renais com viremia, 1 fazia uso de ciclosporina concomitante com o micofenolato mofetil, 1 utilizava ciclosporina e azatioprina e o outro usava apenas do micofenolato mofetil.

Não foi observada viremia para o JCV em nenhum sujeito, entretanto a viremia para o BKV foi detectada em 6 indivíduos, sendo 3 no GTR, 2 no GIR e 1 no

GC. Apesar da detecção da replicação viral em soro ter sido observada, a quantificação do BKV nessas amostras foi inferior a 3.000 cópias por mililitro, quantificação considerada de baixo risco para disfunção renal, já que o *cut-off* padrão para investigação da perda da função renal é indicada a partir da quantificação de 10.000 cópias/mililitro no soro ou plasma, segundo o estudo de Drachenberg et al., 2007. A partir deste *cut-off* deve ser realizado um acompanhamento mais rigoroso da replicação viral através de exames sucessivos e com intervalos menores, além da realização da biópsia renal, afim de encontrar inclusões virais intranucleares (Drachenberg et al., 2007).

Em nosso estudo, se tivéssemos utilizado apenas amostras de sangue para avaliar a detecção dos poliomavírus nos 14 sujeitos com insuficiência renal crônica, apenas 2 (14,2%) seriam positivos para BKV e nenhum para JCV. O fato de que os participantes deste grupo não apresentavam a diurese preservada, nos impediu de analisar a urina. Isso mostraria uma prevalência de detecção dos vírus reduzida, quando comparada a estudos como o de Mitterhofer et al., 2012a em que encontraram uma prevalência de BKV de 33% no sangue e 100% na urina em indivíduos com insuficiência renal crônica, mas ainda com diurese. Porém, ao utilizarmos os fluidos orais como alternativa de fonte para detecção, todos os 14 sujeitos com IRC (100%) foram positivos para BKV e 4 (28,5%) para JCV.

No estudo de Hu et al., 2011, dos 50 indivíduos transplantados renais, analisados por amostras de sangue e urina, apenas 4% foram positivos para o BKV e 42% para JCV e não encontraram viremia em nenhum dos participantes. Mesmo o nosso estudo apresentando um número menor de participantes, encontramos uma prevalência maior de BKV nos indivíduos do GTR, sendo que 8 (66,6%) foram positivos para BKV e 4 (33,3%) para JCV quando analisamos apenas amostras de soro e urina. Além disso, detectamos viremia em 3 indivíduos. Ao analisarmos as amostras de fluidos orais, a prevalência de positividade aumenta para 11 (91,6%) sujeitos positivos para BKV.

Os resultados que observamos em nosso grupo controle concordam com a literatura, com relação a detecção do BKV. De acordo com Hirsch e Steiger, 2003, aproximadamente 90% da população geral é infectada pelo BKV e em nosso estudo 91,6% (11 sujeitos) dos participantes saudáveis do GC foram positivos para o BKV. Já de acordo com o estudo de Hirsch et al., 2013, 70% dos adultos saudáveis são

positivos para o JCV, mas em nosso estudo apenas 6 (50%) sujeitos saudáveis do GC foram positivos para JCV, sendo 3 na urina e 3 em fluido gengival crevicular.

Em nosso estudo, não houve diferença na prevalência de detecção entre os grupos, com relação ao BKV, já que mais de 90% dos sujeitos de todos os 3 grupos foram positivos. Em relação ao JCV, observamos que 50% dos participantes do GC, 14,3% do GIR e 41,7% do GTR exibiram positividade em pelo menos uma amostra. Entretanto, tais resultados não foram estatisticamente significantes, mostrando similaridade de positividade entre os grupos.

Os resultados obtidos neste estudo indicam que a detecção dos poliomavírus humano BK e JC é viável através da utilização dos fluidos orais e pode ser um método alternativo para o diagnóstico e monitoramento de indivíduos com insuficiência renal crônica, transplantados renais e indivíduos saudáveis. Como estudos futuros, sugerimos a avaliação da detecção do BKV e JCV nesses fluidos, em diferentes momentos, afim de conhecermos melhor seu mecanismo de excreção.

7 CONCLUSÕES

Nossos resultados nos permitiram concluir que:

- 1) É possível e viável detectar os poliomavírus humano BK e JC em amostras de saliva, lavado bucal e fluido gengival crevicular;
- 2) A análise dos fluidos orais foi fundamental na detecção dos poliomavírus humano BK e JC, elevando significativamente a frequência de detecção quando comparados as amostras tradicionais de diagnóstico, sangue e urina;
- 3) Foi possível quantificar apenas o BKV, e não o JCV, nas amostras de fluidos orais analisadas no presente estudo;
- 4) Não existiu correspondência na presença e na quantificação do poliomavírus humano BK e JC, em diferentes amostras, do mesmo indivíduo, coletadas no mesmo momento.

REFERÊNCIAS¹

Amir A, Shapiro R, Shulman LM, Mor E, Steinberg R, Fleishhacker H, Bergerin R, Avitzur Y. BK virus infection and its effect on renal function in pediatric liver-transplant recipients: a cross-sectional, longitudinal, prospective study. *Transplantation*. 2011 Oct 27;92(8):943-6.

Arregger AL, Cardoso EM, Tumilasci O, Contreras LN. Diagnostic value of salivary cortisol in end stage renal disease. *Steroids*. 2008 Jan;73(1):77-82.

Berger JR, Miller CS, Mootoor Y, Avdiushko SA, Kryscio RJ, Zhu H. JC Virus Detection in Bodily Fluids: Clues to transmission. *Clin Infect Dis*. 2006; 43: e9-12.

Blicharz TM, Rissin DM, Bowden M, Hayman RB, DiCesare C, Bhatia JS, Grand-Pierre N, Siqueira WL, Helmerhost EJ, Loscalzo J, Oppenheim FG, Walt DR. *Clin Chem*. 2008 September ; 54(9): 1473–1480.

Brennan DC, Agha I, Bohl DL, Schitzler MA, Hardinger KL, Lockwood M, Torrence S, Schuessler R, Roby T, Gaudreault-Keener M and Storch GA. Incidence of BK with Tacrolimus versus Cyclosporine and Impact of preemptive immunosuppression reduction. *Am J Transplantation* 2005;5(3):582-94.

Burger-Calderon R, Madden V, Hallett RA, Gingerich AD, Nickleit V, Webster-Cyriaque J. Replication of oral BK virus in human salivary gland cells. *J Virol*. 2014 Jan;88(1):559-73.

Chahin S, Berger JR. A risk classification for immunosuppressive treatment-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurovirol*. 2014 Nov 18. [Epub ahead of print]

Corstjens PL, Abrams WR, Malamud D. Detecting viruses by using salivary diagnostics. *J Am Dent Assoc*. 2012 Oct;143(10 Suppl):12S-8S.

Delbue S, Ferraresso M, Ghio L, Carloni C, Carluccio S, Belingheri M, Edefonti A, Ferrante P. A review on JC virus infection in kidney transplant recipients. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:926391.

Drachenberg CB, Hirsch HH, Papadimitriou JC, Gosert R, Wali RK, Munivenkatappa R, Nogueira J, Cangro CB, Haririan A, Mendley S, Ramos E. Polyomavirus BK versus JC replication and nephropathy in renal transplant recipients: a prospective evaluation. *Transplantation*. 2007 Aug 15;84(3):323-30.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Dörries K, ter Meulen V. Progressive multifocal leucoencephalopathy: detection of papovavirus JC in kidney tissue. *J Med Virol.* 1983;11(4):307-17.

Eash S, Manley K, Gasparovic M, Querbes W, Atwood WJ. The human polyomaviruses. *Cell Mol Life Sci.* 2006 Apr;63(7-8):865-76.

Fatahzadeh M, Schlecht NF, Chen Z, Bottalico D, McKinney S, Ostoloza J, Dunne A, Burk RD. Oral human papillomavirus detection in older adults who have human immunodeficiency virus infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2013 Apr;115(4):505-14.

Fioriti D, Videtta M, Mischitelli M, Degener AM, Russo G, Giordano A, Pietropaolo V. The human polyomavirus BK: Potential role in cancer. *J Cell Physiol.* 2005 Aug;204(2):402-6.

Flaegstad T, Andresen PA, Johnsen JI, Asomani SK, Jorgensen GE, Vignarajan S, Kjuul A, Kogner P, Traavik T. A possible contributory role of BK virus infection in neuroblastoma development. *Cancer Res.* 1999 Mar 1;59(5):1160-3.

Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B. New human papovavirus (BK) isolated from urine after transplantation. *Lancet* 1971; 1: 1253_57.

Giannobile WV, McDevitt JT, Niedbala RS, Malamud D. Translational and Clinical Applications of Salivary Diagnostics. *Adv Dent Res*; 2011; 23(4): 375-80.

Goudsmit J, Wertheim-van Dillen P, van Strien A, van der Noordaa J. The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils. *J Med Virol.* 1982;10(2):91-9.

Heath EM, Morken NW, Campbell KA, Tkach D, Boyd EA, Strom DA. Use of buccal cells collected in mouthwash as a source of DNA for clinical testing. *Arch Pathol Lab Med.* 2001 Jan;125(1):127-33.

Hirsch HH. Polyomavirus BK nephropathy: a (re-)emerging complication in renal transplantation. *Am J Transplant.* 2002 Jan;2(1):25-30.

Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, Passweg J, Klimkait T, Mihatsch MJ, Steiger J. Prospective study of Polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N Engl J Med.* 2002; 347(7):487-96.

Hirsch HH, Steiger J. Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis.* 2003 Oct;3(10):611-23.

Hirsch HH. BK virus: opportunity makes a pathogen. *Clin Infect Dis* 2005; 42(3):354-60.

Hirsch HH, Kardas P, Kranz D and Leboueuf C. The human JC polyomavirus (JCPyV): virological background and clinical implications. *APMIS* 2013 121:685-727.

Hu J, Zhao H, Huang Y, Zhang X, Gao H, Yang M, Fan J, Ma W. Prospective study of posttransplant polyomavirus infections in renal transplant recipients. *Exp Clin Transplant*. 2011 Jun;9(3):175-80

Huang G, Chen W, Wang C, Fei J, Deng S, Qiu J, Chen L. Noninvasive tool for the diagnosis of polyomavirus BK associated nephropathy in renal transplant recipients. *Diag Microbiol Infect Dis*. 2013; 75: 2992-7.

Ioannidou E, Swede H, Dongari-Bagtzoglou A. Periodontitis Predicts Elevated C-reactive Protein Levels in Chronic Kidney Disease. *J Dent Res*. 2011;90(12):1411–5.

Jeffers LK, Madden V, Webster-Cyriaque J. BK virus has tropism for human salivary gland cells in vitro: Implications for transmission. *Virology*. 2009; 394:183-93.

Johnson NW, Malamud D, Reznik D, Speicher DJ, Phelan J. Mucosal Fluids and Biomarkers of Clinical Disease: Workshop 3B. *Adv Dent Res*. 2011; 23(1):137-41.

Kho HS, Lee SW, Chung SC, Kim YK. Oral manifestations and salivary flow rate, pH and Buffer capacity in patients with end-stage renal disease undergoing hemodialysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999; 88(3): 316-9

Klemenc P, Skaleri U, Artnik B, Nogrsek P, Marin J. Prevalence of some herpesviruses in gingival crevicular fluid. *J Clin Vir*. 2005; 34:147-52

Kumar D. Emerging viruses in transplantation. *Curr Opin Infect Dis*. 2010; 23: 374-8.

Ling PD, Lednicky JA, Keitel WA, Poston DG, White ZS, Peng RS, Liu Z, Mehta SK, Pierson DL, Rooney CM, Vilchez RA, Smith O, Butel JS. The dynamics of herpesvirus and polyomavirus reactivation and shedding in healthy adults: a 14 month longitudinal study. *J Infect Dis* 2003; 187:1571-80

Little JM, Falace DA, Miller CS, Rhodus NL. Manejo Odontológico do paciente Clinicamente Comprometido. 7^a ed. Siqueira MAS, tradutor. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda; 2009.

Machado DM, Fink MC, Pannuti CS, Succini RCM, Machado AA, Carmo FB, Gouvêa AFB, Urbano PR, Beltrão SV, Santos ICL, Machado CM. Human polyomaviruses JC and BK in the urine of brazilian children and adolescents vertically infected by HIV. Mem Inst Oswaldo Cruz 2011 Dec; 106(8):931-5.

Malamud D. Saliva as a diagnostic fluid. Dent Clin N Am. 2011; 55:159-78.

Mayr M, Nickeleit V, Hirsch HH, Michael Dickenmann M, Mihatsch MJ, Steiger J. Polyomavirus BK Nephropathy in a Kidney Transplant Recipient: Critical Issues of Diagnosis and Management. Am J Kid Dis. 2001;38(3):E13

Mitterhofer AP, Umbro I, Pietropaolo V, Meçule A, Russo GE, Tinti F, Fiacco F, Poli L, Bellizzi A, Anzivino E, Ferretti G, Berloco PB, Chiarini F, Taliani G. Polyomavirus BK Infection en End-Stage Renal disease: Analysis of Viral Replication in Patients on Hemodialysis or Peritoneal Dialysis. Transplant Proc. 2012a; 44:1860-72.

Mitterhofer B, Tinti F, Umbro I, Pietropaolo V, Fiacco F, Bellizzi A, Anzivino E, SG Corradini, Poli L, Rossi M, Berloco PB, Ferretti G, Chiarini F, Taliani G. Polyomavirus BK infection before liver transplantation in patients with Chronic Kidney Disease. Transplant Proc. 2012b; 44: 1934-7.

Padgett BL, Walker DL, Zu Rhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. Lancet. 1971; 1: 1257-60.

Pal A, Sirota L, Maudru T, Peden K, Lewis Jr AM. Real time, quantitative PCR assays for the detection os viru-specific DNA in samples with mixed populations of polyomaviruses. J Virol Methods. 2006 Jul; 135(1):32-42.

Pinto VG. Saúde bucal: odontologia social e preventiva. São Paulo: Santos; 1992. 415 p.

Pires EP, Bernardino-Vallinoto CV, Alves DM, Migone SR, Machado LF, Ishak MO, Ishak R, Cayres-Vallinoto IM, Vallinoto AC. Prevalence of infection by JC and BK polyomaviruses in kidney transplant recipients and patients with chronic renal disease. Transpl Infect Dis. 2011 Dec;13(6):633-7.

Pollock JJ, Andors L, GulumogluA, Ells PF. Direct measurement of hepatitis B viral antibody and antigen markers in gingival crevicular fluid. Oral Surg. 1984; 57: 499-503.

Priyanka N, Kalra N, Shanbhag N, Kumar K, Seema, Brijet B, Uma SR, Pradeep AR. Recent approaches in saliva as a credible periodontal diagnostic and prognostic marker. AOSR 2012;2(1):40-46

Proctor R, Kumar N, Stein A, Moles D, Porter S. Oral and dental aspects of chronic renal failure. J Dent Res 2005; 84(3):199-208

Purighalla R, Shapiro R, McCauley J, Randhawa P. BK virus infection in a kidney allograft diagnosed by needle biopsy. Am J Kidney Dis. 1995 Oct;26(4):671-3.

Robaina TF, Mendes GS, Benati FJ, Pena GA, Silva RC, Montes MAR, Otero R, Castro GF, Camara FP, Santos N. Polyomavirus in saliva of HIV infected children, Brazil. Emerg Infec Dis. 2013a; 19(1): 155-7

Robaina TF, Mendes GS, Benati FJ, Pena GA, Silva RC, Montes MAR, Janini MER, Câmara FP, Santos N. Shedding of Polyomavirus in the saliva of immunocompetent individuals. J Med Virol. 2013b; 85: 144-8.

Tokars JI, Miller ER, Alter MJ, Arduino MJ. National surveillance of dialysis – associated diseases en the United States, 1977. Semin Dial. 2000; 13(2):75-85.

Tomás I, Marinho JS, Limeres J, Santos MJ, Araújo L, Diz P. Changes in salivary composition in patients with renal failure. Arch Oral Bio. 2008; 53(6):528-32.

Vanchiere JA, Abudayyeh S, Copeland CM, Lu LB, Graham DY, Butel JS. Polyomavirus shedding in the stool of healthy adults. J Clin Microbiol. 2009; 47(8):2388-91.

Walt DR, Blicharz TM, Hayman RB, Rissin DM, Bowden M, Siqueira WL, Helmerhorst EJ, Grand-Pierre N, Oppenheim FG, Bhatia JS, Little FF, Brody JS. Microsensor arrays for saliva diagnostics. Ann N Y Acad Sci. 2007 Mar;1098:389-400.

Westervelt JD, Alexander BD, Costac SF, Millerd SE, Howelld DN, Smith SR. Detection of BK polyomavirus after kidney transplatation: a comparison of urine electron microscopy with plasma polymerase chain reaction. Clin Transplant. 2013; 27: E42-8.

Yin WY, Lu MC, Lee MC, Liu SC, Lin TY, Lai NS. A correlation between polyomavirus JC virus quantification and genotypes in renal transplantation. Am J Surg. 2010 Jul;200(1):53-8.

APÊNDICE A – Questionário

Prontuário: _____ Data: ____/____/____ Data visita inicial: ____/____/____

Nome: _____

Telefone: () _____

Nacionalidade: _____

Naturalidade: _____

Escolaridade: _____

Profissão: _____

Gênero: Masculino ☐ Feminino ☐

Data de Nascimento: ____/____/____

Idade: _____

Raça: Negra ☐ Branca ☐ Asiática ☐ Latina ☐ Indígena ☐ Outras/Desconhecida ☐

Medicações em uso:

O paciente tem história de algumas das doenças listadas abaixo?

Hipertensão Sim ☐ Não ☐ Não sabe ☐

Diabetes Tipo: _____ Sim ☐ Não ☐ Não sabe ☐

Sopro cardíaco Sim ☐ Não ☐ Não sabe ☐

Prolapso da válvula mitral Sim ☐ Não ☐ Não sabe ☐

Angina ou dor no peito Sim ☐ Não ☐ Não sabe ☐

Infarto recente do Miocárdio Sim ☐ Não ☐ Não sabe ☐

Doença da tireóide Sim ☐ Não ☐ Não sabe ☐

Hepatite Tipo: _____ Sim ☐ Não ☐ Não sabe ☐

Anemia Sim ☐ Não ☐ Não sabe ☐

Doença Psiquiátrica Tipo: _____ Sim ☐ Não ☐ Não sabe ☐

Gastrite Sim ☐ Não ☐ Não sabe ☐

Refluxo Gastroesofágico Sim ☐ Não ☐ Não sabe ☐

Alergia a Medicamentos Qual? _____ Sim ☐ Não ☐ Não sabe ☐

Outras: _____

Apresentou infecções recorrentes nos últimos anos? Não ☐ Sim ☐

Quais? _____

Data do início da doença: _____

Data do início da diálise: _____ Dias de diálise: _____

Realizou algum transplante? Não ☐ Sim ☐ Quando? _____

Fístula arteriovenosa: Não ☐ Sim ☐ Onde? _____

História passada de uso de álcool: Não ☐ Sim ☐ Bebe atualmente: Não ☐ Sim ☐

Qual a frequência do uso do álcool? Diariamente ☐ Semanalmente ☐

2-4 vezes por semana ☐ Nos finais de semana ☐ Ocasionalmente ☐

Você fuma?

➤ Não ☐ Já foi fumante? Não ☐ Sim ☐

Há quanto tempo? _____ Quantos cigarros fumava por dia? _____

Por quanto tempo fumou? _____

➤ Sim ☐

Quantos cigarros por dia? _____ Há quanto tempo? _____

TRATAMENTO ODONTOLÓGICO

Queixa principal? _____

Tem dor nos dentes? Não ☐ Sim ☐ Localização: _____

Apresentou alguma infecção na boca ultimamente? Não ☐ Sim ☐

Quais? _____

Apresenta aftas com frequência? Não ☐ Sim ☐

Apresenta episódios de herpes? Não ☐ Sim ☐

Qual a última visita ao dentista? _____

Com que frequência vai ao dentista? _____

Tem sensação de boca seca? Não ☐ Sim ☐ Dentes amolecidos? Não ☐ Sim ☐

Sangramento ao escovar os dentes? Não ☐ Sim ☐

EXAME BUCAL

Cárie ☐ Gengivite ☐ Periodontite ☐ Xerostomia ☐ Linfonodos palpáveis ☐

Ardência bucal ☐ Lesão em boca ☐ Quais? _____

Aumento de glândulas salivares ☐ Quais? _____

Hábitos parafuncionais ☐ Quais? _____

Erosão dental ☐ SS ☐ Mobilidade ☐ Retração Gengival ☐ Hiperplasia Gengival ☐

Dentes analisados com o Periopaper: _____ - _____ - _____ - _____

CPOD: _____

AVALIAÇÃO PERIODONTAL

Dente	
LEC-MG (-, 0, +)	
PCS (>4mm)	
NCI (LEC-MG + PCS)	
SS (Nº pts x 100/Nº dentes x 6)	
Mobilidade (0, 1, 2, 3)	
IP (1, 2, 3, 4)	

Dente	
LEC-MG (-, 0, +)	
PCS (>4mm)	
NCI (LEC-MG + PCS)	
SS (Nº pts x 100/Nº dentes x 6)	
Mobilidade (0, 1, 2, 3)	
IP (1, 2, 3, 4)	

Dente	
LEC-MG (-, 0, +)	
PCS (>4mm)	
NCI (LEC-MG + PCS)	
SS (Nº pts x 100/Nº dentes x 6)	
Mobilidade (0, 1, 2, 3)	
IP (1, 2, 3, 4)	

Dente	
LEC-MG (-, 0, +)	
PCS (>4mm)	
NCI (LEC-MG + PCS)	
SS (Nº pts x 100/Nº dentes x 6)	
Mobilidade (0, 1, 2, 3)	
IP (1, 2, 3, 4)	

16/17	11	26/27
46/47	31	36/37

(0) Hígido
 (1) Sangramento
 (2) Cálculo
 (3) Bolsa de 4-5mm
 (4) Bolsa maior ou igual a 6mm
 (X) Sextante excluído (menos de 2 dentes presentes)

APÊNDICE B: Tabela com as informações coletadas durante a anamnese.

GRUPO	PAC	GÊNERO	IDADE	DOENÇA DE BASE	HIPERTENSÃO	DIABETES	ALTERAÇÃO NAS PARATIREÓIDES	HEPATITE	ANOS DE DIÁLISE	ANOS DE PÓS-TRANSPLANTE	FUMO	BOCA SECA	CPOD	DP
GIR	1	MASC	46	Hipertensão	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	3	-	SIM	SIM	0.28	NÃO
	2	MASC	48	Nefrite	SIM	NÃO	SIM	HEP C	24	-	NÃO	SIM	0.39	SIM
	3	FEM	48	Hipertensão	SIM	NÃO	SIM	NÃO	6	-	SIM	NÃO	0.71	NÃO
	4	MASC	29	Hereditário	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	5	-	SIM	NÃO	0.5	NÃO
	5	MASC	55	Hipertensão	SIM	TIPO 2	NÃO	NÃO	1	-	NÃO	NÃO	0.5	NÃO
	6	FEM	56	Hereditário	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	6	-	NÃO	NÃO	0.6	NÃO
	7	MASC	51	Diabetes tipo 2	NÃO	TIPO 2	NÃO	NÃO	4	-	NÃO	NÃO	0.14	SIM
	8	FEM	34	Hereditário	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	0.08	-	NÃO	NÃO	0.71	NÃO
	9	FEM	65	Diabetes tipo 2	SIM	TIPO 2	NÃO	NÃO	8	-	NÃO	NÃO	0.78	NÃO
	10	FEM	53	Hipertensão	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	9	-	NÃO	NÃO	1.0	NÃO
	11	MASC	56	Hipertensão	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	10	-	NÃO	NÃO	1.0	SIM
	12	MASC	66	Hipertensão	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	9	-	NÃO	NÃO	0.5	SIM
	13	FEM	32	Lupus E. Sist.	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	8	-	NÃO	NÃO	0.7	SIM
	14	FEM	44	Diabetes 1	NÃO	TIPO 1	SIM	NÃO	2	-	NÃO	NÃO	0.75	NÃO
GTR	1	MASC	45	Cálculo renal	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	10	3	SIM	NÃO	0.42	SIM
	2	MASC	42	Uso de AINES	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	0.7	2	SIM	NÃO	0.92	NÃO
	3	FEM	34	Diabetes tipo 1	SIM	TIPO 1	NÃO	NÃO	0	10	SIM	SIM	0.39	NÃO
	4	MASC	54	Hipertensão	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	1	14	SIM	NÃO	0.35	NÃO
	5	FEM	49	Diabetes tipo 2	SIM	TIPO 2	NÃO	HEP A	5	14	NÃO	SIM	0.85	NÃO
	6	MASC	43	Diabetes tipo 2	SIM	TIPO 2	NÃO	NÃO	9	12	SIM	NÃO	0.32	NÃO
	7	MASC	65	Diabetes tipo 2	NÃO	TIPO 2	SIM	NÃO	10	3	NÃO	NÃO	0.67	SIM
	8	MASC	51	Diabetes tipo 2	SIM	TIPO 2	SIM	NÃO	7	5	SIM	NÃO	0.5	NÃO
	9	FEM	42	Nefrite	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	5	16	SIM	NÃO	0.34	NÃO
	10	FEM	51	Infecção urinária	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	7	11	NÃO	NÃO	0.75	NÃO
	11	MASC	53	Diabetes tipo 2	SIM	TIPO 2	NÃO	NÃO	3	13	NÃO	NÃO	0.31	SIM
	12	MASC	49	Nefrite	SIM	NÃO	NÃO	HEP C	2	4	NÃO	NÃO	0.78	SIM
GC	1	FEM	51	-	NÃO	NÃO	NÃO	HEP A	-	-	SIM	NÃO	0.5	NÃO
	2	FEM	29	-	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	-	-	SIM	SIM	0.17	NÃO
	3	FEM	52	-	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	-	-	SIM	NÃO	0.44	NÃO
	4	FEM	28	-	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	-	-	SIM	NÃO	0.10	NÃO
	5	FEM	36	-	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	-	-	NÃO	NÃO	0.5	SIM
	6	FEM	34	-	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	-	-	SIM	NÃO	0.17	NÃO
	7	FEM	52	-	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	-	-	NÃO	NÃO	0.6	NÃO
	8	FEM	55	-	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	-	-	NÃO	SIM	0.57	NÃO
	9	FEM	62	-	NÃO	TIPO 2	SIM	HEP A	-	-	NÃO	NÃO	0.85	SIM
	10	FEM	54	-	NÃO	TIPO 2	NÃO	NÃO	-	-	SIM	NÃO	0.85	NÃO
	11	FEM	50	-	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	-	-	SIM	NÃO	0.42	NÃO
	12	FEM	48	-	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	-	-	NÃO	NÃO	0.53	NÃO

APÊNDICE C – Detecção e quantificação do poliomavírus humano BK em amostras de saliva, lavado bucal, fluido gengival crevicular, soro e urina dos participantes da pesquisa

Grupo	Pac	BKV							
		Saliva	Lavado	Fluido Gengival <u>Crevicular</u>				Soro	Urina
				Sítio 1	Sítio 2	Sítio 3	Sítio 4		
GIR	1	3974	NEG	NEG	2964	NEG	NEG	x	x
	2	1123	3530	NEG	NEG	NEG	NEG	x	x
	3	1793	11727	NEG	2033	NEG	NEG	NEG	x
	4	4602	14460	NEG	15290	3681	NEG	1019	x
	5	NEG	2005	NEG	3554	NEG	NEG	NEG	x
	6	NEG	2242	4569	NEG	NEG	NEG	NEG	x
	7	NEG	3811	NEG	NEG	NEG	POS NQ	POS NQ	x
	8	3732	1910	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	x
	9	NEG	NEG	POS NQ	NEG	NEG	NEG	NEG	x
	10	3113	2507	2322	NEG	NEG	NEG	NEG	x
	11	NEG	2507	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	x
	12	2354	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	x
	13	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS NQ	NEG	x
	14	NEG	POS NQ	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	x
GTR	1	3070	1171	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	1022239
	2	2322	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	1200283
	3	3655	POS NQ	1517	3006	3006	2338	NEG	101398
	4	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	15290	2823	5329
	5	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	6570	2005	1923
	6	NEG	2823	NEG	NEG	NEG	NEG	x	2903
	7	1781	NEG	5958	NEG	NEG	NEG	NEG	x
	8	NEG	3732	NEG	1768	14869	NEG	POS NQ	NEG
	9	POS NQ	NEG	3892	NEG	NEG	2274	NEG	NEG
	10	6803	NEG	NEG	1465	NEG	1188	NEG	NEG
	11	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS NQ	NEG	POS NQ
	12	NEG	NEG	NEG	NEG	x	NEG	NEG	NEG
GC	1	1239	1116	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	3706
	2	3518	POS NQ	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	x
	3	NEG	1366	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	4	3732	2614	2765	NEG	POS NQ	1155	NEG	NEG
	5	7398	NEG	4116	1950	1696	25453	NEG	9713
	6	1582	NEG	POS NQ	7045	POS NQ	NEG	NEG	x
	7	NEG	NEG	3223	NEG	NEG	POS NQ	NEG	NEG
	8	POS NQ	POS NQ	NEG	12488	NEG	NEG	NEG	POS NQ
	9	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	1936	NEG
	10	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	11	NEG	3579	NEG	NEG	NEG	4750	NEG	NEG
	12	1131	NEG	NEG	NEG	1672	NEG	NEG	NEG

Legenda: GIR= grupo com insuficiência renal crônica; GTR= grupo transplantado renal; GC= grupo controle; NEG= negativo; POS NQ= amostra positiva não quantificável; x= não coletado

APÊNDICE D – Detecção e quantificação do poliomavírus humano JC em amostras de saliva, lavado bucal, fluido gengival crevicular, soro e urina dos participantes da pesquisa

Grupo	Pac	JCV							
		Saliva	Lavado	Fluido Gengival Crevicular				Soro	Urina
				Sítio 1	Sítio 2	Sítio 3	Sítio 4		
GIR	1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	x	x
	2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	x	x
	3	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	x
	4	POS NQ	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	x
	5	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	x
	6	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	x
	7	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	x
	8	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	x
	9	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	x
	10	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	x
	11	POS NQ	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	x
	12	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	x
	13	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	x
	14	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	x
GTR	1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS NQ
	2	POS NQ	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS NQ
	3	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS NQ
	4	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	42370
	5	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	6	NEG	NEG	NEG	NEG	POS NQ	NEG	x	NEG
	7	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	x
	8	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	9	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	10	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	11	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	12	NEG	NEG	NEG	NEG	x	NEG	NEG	NEG
GC	1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS NQ
	2	NEG	NEG	NEG	POS NQ	NEG	NEG	NEG	x
	3	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	4	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	5	NEG	NEG	NEG	POS NQ	NEG	POS NQ	NEG	NEG
	6	NEG	NEG	POS NQ	NEG	NEG	NEG	NEG	x
	7	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	4471
	8	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	9	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	10	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	11	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	12	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	69.303.710

Legenda: GIR= grupo com insuficiência renal crônica; GTR= grupo transplantado renal; GC= grupo controle; NEG= negativo; POS NQ= amostra positiva não quantificável; x não coletado

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA Título da Pesquisa: DETECÇÃO DOS POLIOMAVÍRUS HUMANO JC E BK EM SALIVA, FLUIDO GENGIVAL CREVICULAR E SANGUE DE PACIENTES COM INSUFICIÊNCIA RENAL
Pesquisador: Marina Helena Cury Gallottini

Área Temática: Versão: 4 CAAE: 15042613.6.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de Sao Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER Número do Parecer: 500.250

Data da Relatoria: 18/12/2013

Apresentação do Projeto:

A insuficiência renal é caracterizada pela perda da capacidade de filtração dos nefrons. De acordo com seu estágio, o tratamento é baseado na introdução de terapias de substituição renal, como a hemodiálise e a diálise peritoneal, além do transplante renal. Estes tratamentos levam a alterações imunológicas nos pacientes submetidos a eles, permitindo a reativação de vírus que encontram-se latentes e sem manifestações clínicas

consideráveis em indivíduos imunocompetentes. Uns destes, são os vírus da família dos Poliomavírus humano, mais especificamente, os vírus BKV e JCV, que são associados ao desenvolvimento de nefrite em pacientes transplantados renais, podendo culminar com a perda do órgão transplantado. Seu principal local de latência são os rins, e por isso, sua detecção pode ser feita através de amostras de sangue e urina. Além disso, estudos mostram que as glândulas salivares também servem como local de depósito destes vírus, podendo a saliva ser tanto uma via de contaminação como de diagnóstico para presença destes vírus.

Objetivo da Pesquisa:

Detectar a presença e quantificar os poliomavírus humanos (BK e JC) na saliva e fluido gengival crevicular de pessoas com insuficiência renal crônica, em terapia dialítica, comparando com os valores encontrados no sangue e urina dos mesmos indivíduos e verificar se há relação entre doença periodontal e presença e quantidade deste vírus na saliva e no fluido crevicular.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos ou desconfortos do exame clínico e coleta de saliva serão mínimos, já que o questionário e o exame bucal são parte dos cuidados a serem tomados com estes pacientes. Com relação à coleta de sangue, há risco da formação de hematoma no local da coleta, associado ou não à dor local. O poliomavírus humano nos subtipos

BK e JC estão associados à casos de insucesso de transplante renal. Desta forma, a detecção deste vírus na saliva permitirá não só a determinação de um teste menos invasivo para detecção destes vírus, bem como o encaminhamento destes pacientes para avaliação especializada previamente ao transplante renal.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é importante pois objetiva viabilizar a utilização da saliva como meio de diagnóstico da presença do poliomavírus humanos (BK e JC). Este fluido tem coleta mais simples e mais confortável para o paciente. Os riscos, apesar de presentes, são justificados e aceitáveis.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados TCLE, onde foram incluídos o endereço e o CEP, a carta de autorização da co-participante, em que serão realizadas as análises e anexado parecer consubstanciado da CONEP.

Recomendações:**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 18 de Dezembro de 2013

Maria Gabriela Haye Biazevic (Coordenador)

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**“Detecção dos poliomavírus humano JC e BK em saliva, fluido gengival crevicular e sangue de pacientes com insuficiência renal crônica”**

Este termo tem a finalidade de esclarecer ao participante sobre o projeto de pesquisa “Detecção dos poliomavírus humano JC e BK em saliva, fluido gengival crevicular, sangue e urina de pacientes com insuficiência renal crônica e transplantados renais” a ser desenvolvido pela aluna de mestrado Talita de Castro Alves, sob orientação da Profa. Dra. Marina Helena Cury Gallottini.

Esse estudo visa detectar a possível presença dos poliomavírus humano na saliva e sangue de pacientes com insuficiência renal crônica em tratamento dialítico, em transplantados renais e em indivíduos saudáveis.

Os pacientes que concordarem em participar da pesquisa responderão a um questionário sobre a história médica atual e passada, medicações em uso e dados demográficos (sexo, idade, raça). Será também realizado um exame de boca simples para a detecção de doença periodontal (gengiva), cárie e eventuais lesões na boca.

Em todos os indivíduos desta pesquisa, será realizada uma limpeza dos dentes (profilaxia) e serão coletadas uma amostra de sua saliva, um bochecho com Listerine®, uma amostra do fluido de sua gengiva, amostra de sangue e uma de urina para avaliar a presença dos vírus.

Esta pesquisa lhe trará o benefício de saber se você tem ou não alguma doença de boca e, se ela existir, você poderá ser encaminhado para tratá-la. Além disso, poderemos detectar a presença destes vírus e também encaminhá-lo para avaliação especializada. Sendo que indivíduos saudáveis não apresentam nenhum risco em relação a presença desse tipo de vírus.

Os riscos e desconfortos do exame clínico, preenchimento do questionário e coleta de saliva serão mínimos, já que fazem parte dos cuidados de todos os pacientes. Com relação a coleta de sangue, há risco de formação de hematoma no local da coleta.

A identificação do paciente será preservada de forma que seu nome e dados pessoais não aparecerão nas publicações subsequentes à pesquisa nem serão citados em cursos, palestras ou aulas expositivas.

O paciente não receberá e não efetuará nenhum pagamento pela sua participação na pesquisa, nem para a realização dos exames laboratoriais.

Os exames a serem realizados serão:

- Coleta de saliva: através da eliminação de toda a sua saliva de 5 minutos em um recipiente e através de um bochecho com Listerine®, que também será colocado em um recipiente próprio e estéril;
- Fluido da gengiva: será coletado com a ajuda de um pequeno papel absorvente colocado pelo dentista em sua gengiva;
- Sangue: Um único tubo de sangue será coletado através da punção na região da dobra do cotovelo.
- Urina: através da eliminação de uma pequena quantidade de urina em um tubo estéril, específico para essa finalidade.

Todas as amostras serão analisadas para detectar a presença do vírus.

Existem outros vírus que podem estar presentes nas amostras coletadas das pessoas com insuficiência renal crônica e por isso ela poderá ser necessária para outros estudos, desta forma:

() NÃO AUTORIZO a utilização de dados ou do material biológico (saliva, fluido gengival e sangue) em outra pesquisa. Neste caso, serão descartados em lixo biológico.

() SIM AUTORIZO a utilização de dados ou material biológico (saliva, fluido gengival e sangue) em outra pesquisa. Para utilizar os dados ou material biológico (saliva, fluido gengival e sangue) em outra pesquisa você quer ser consultado?

() NÃO quero ser consultado da utilização dos meus dados ou material biológico (saliva, fluido gengival e sangue) em outra pesquisa, desde que a nova pesquisa seja aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

() SIM quero ser consultado da utilização dos meus dados ou material biológico (saliva, fluido gengival e sangue) em outra pesquisa.

Você poderá ter todas as informações que quiser sobre esta pesquisa ou pesquisas futuras que envolvam suas amostras. Fica claro que você terá o direito de não aceitar participar da pesquisa ou de interromper a realização de seu exame a qualquer momento sem prejuízo de qualquer benefício que esteja recebendo.

A qualquer momento durante o andamento do estudo a pesquisadora Talita de Castro Alves estará disponível para dúvidas e esclarecimentos pelo telefone (11) 3091-7838.

Se houver dúvidas sobre a ética da pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia (Av. Lineu Prestes 2227, 05508-000 São Paulo, telefone 30917960 ou pelo e-mail cepfo@usp.br). O paciente receberá uma cópia deste termo de consentimento.

Eu, _____, portador do RG _____ li e/ou ouvi as informações deste termo e compreendi para que serve o estudo e qual o procedimento a qual serei submetido. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará o meu tratamento. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e que não receberei dinheiro por participar deste estudo e que devo entrar em contato com a Talita de Castro Alves caso tenha alguma dúvida. Eu concordo voluntariamente em participar do estudo “Detecção dos Poliomavírus humano JC e BK em saliva, fluido gengival crevicular, sangue e urina de pacientes com insuficiência renal crônica e transplantados renais”.

Assinatura do participante

Assinatura do pesquisador

São Paulo, _____ de _____ de _____.