MARILIA ANDRADE FIGUEIREDO

**Detecção dos poliomavirus humano JC e BK em pacientes no pré transplante
de fígado**

São Paulo

2016

MARILIA ANDRADE FIGUEIREDO

**Detecção dos poliomavirus humano JC e BK em pacientes no pré transplante
de fígado**

Versão Corrigida

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

Área de concentração: Patologia Bucal e Maxilo Facial e Pacientes Especiais

Orientadora: Karem López Ortega

São Paulo

2016

Figueiredo MA. Detecção dos poliomavirus humano JC e BK em pacientes no pré transplante de fígado . Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: / /2016

Banca Examinadora

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Dedico este trabalho a minha família.

Meus pais Pascoal e Sonia, minha irmã Alessandra, meu sobrinho Rafael e aos meus avós Francisco e Iracema, Ruy e Irene.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por tornar possível este sonho.

Aos meus pais, Pascoal e Sonia, meus maiores incentivadores. Foram minha força e apoio todos os dias, sem eles nada seria possível. Obrigada pela paciência, carinho, amor e garra que vocês me ensinaram a ter.

A minha irmã Alessandra, pelo apoio que me ajudou a concluir este trabalho.

Ao meu sobrinho Rafael pela alegria que me traz sempre.

À minha orientadora Karem Ortega pelos conselhos, paciência, ensinamentos, incentivo e confiança, para a realização deste trabalho.

É uma honra tê-la como orientadora!

Aos professores Paulo Braz e Maria Cristina Fink, pelos ensinamentos e auxílio.

Obrigada pela parceria e por tornarem este trabalho possível.

A Jeanne, sem ela as coletas não teriam sido possíveis, obrigada por me ensinar e ajudar sempre.

Ao Frederico Buhatem, pela amizade, confiança e ensinamentos, sem ele este mestrado também não seria possível.

Aos professores do Departamento de Patologia Bucal da FOU SP, Marina, Suzana, Marília, Décio e Fábio Daumas.

Aos meus queridos amigos da pós-graduação, em especial Karin, Talita, Dani, Cíntia, Rubens, Dmytri, Natalia e Nathalia. Vocês foram essenciais no dia a dia. Obrigada pelo carinho e apoio sempre!

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

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

As minhas amigas Aline e Carol, que me apoiaram sempre.

E a todas as pessoas que aceitaram participar desta pesquisa.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”. (Albert Einstein)

RESUMO

Figueiredo MA. Detecção dos poliomavirus humano JC e BK em pacientes no pré transplante de fígado. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016 Versão Corrigida.

Pacientes no pré-transplante de fígado podem apresentar diversas complicações da cirrose. Uma importante complicação é o hiperesplenismo, que pode resultar no sequestro de leucócitos e na consequente diminuição de neutrófilos e linfócitos, tornando o paciente, teoricamente, mais suscetível a infecções pelos vírus BKV e JCV. Por outro lado, esses pacientes também podem apresentar comprometimento renal (síndrome hepatorenal) e de sistema nervoso central (encefalopatia hepática). Com complicações como essas e como esses pacientes apresentam-se com a resposta celular imune circulante comprometida, pode ser interessante investigar a presença dos poliomavirus nesses pacientes. O objetivo deste trabalho foi identificar e quantificar os poliomavirus BKV e JCV em saliva, lavado bucal, sangue e urina, de pacientes no pré-transplante de fígado. Para o grupo de estudo foram selecionados, 21, pacientes cirróticos, em fila de transplante de fígado, de ambos os sexos, com idade superior a 18 anos e para o grupo controle foram selecionados 20 pacientes normorreativos, de ambos os sexos, maiores de 18 anos. Nesses pacientes foram realizadas coletas de fluídos, urina, saliva, lavado bucal, e sangue. Após a coleta e congelamento das amostras, foram realizadas pesquisas de detecção e quantificação do poliomavírus humano dos subtipos BK e JC através do método de PCR em tempo real. Quinze pacientes (71,42%) do GE apresentaram-se positivos para o BKV em pelo menos uma amostra, mas nenhum dos pacientes desse grupo apresentou síndrome hepatorenal. Por outro lado, 66,66% desses pacientes apresentaram encefalopatia hepática, mas, apesar de 10 pacientes serem positivos para o JCV, em nenhum deles foi possível quantificar a carga viral ou associar a presença do vírus com a doença clínica. Quanto às amostras, no GE, 21 (25%) foram positivas para BKV e 10 (11,90%) para JCV e no GC 27 (34,61%) foram positivas para BKV e 6 (7,69%) para JCV. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,52$ e $p=0,25$).

No GE encontramos um panorama semelhante ao GC, referente a presença do vírus em lavado, sangue e urina. A maior diferença entre as amostras apresentou-se na identificação do BKV em saliva. Assim foi possível concluir que pacientes cirróticos em fila de transplante hepático não apresentam maior prevalência de BKV ou JCV do que pacientes normorreativos e as complicações da cirrose (encefalopatia hepática e síndrome hepatorenal) não estão associadas à presença desses vírus. Em pacientes normorreativos os fluídos bucais são equivalentes a urina na detecção do BKV, mas a saliva não é um bom fluido para detecção do BKV em pacientes cirróticos

Palavras Chave: Hepatopatias. Pacientes Cirróticos. BKV. JCV. Vírus.

ABSTRACT

Figueiredo MA. Detection of human polyomavirus JC and BK in patients undergoing liver transplantation. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Corrected Version.

Patients in the liver pre-transplantation can present several complications of cirrhosis. A major complication is hypersplenism, which can result in sequestration of leukocytes and the consequent decrease of neutrophils and lymphocytes, making the patient theoretically more susceptible to infection by BKV and JCV virus. Furthermore, these patients may also have renal impairment (hepatorenal syndrome) and central nervous system (hepatic encephalopathy). With complications like these and how these patients present with impaired current cellular immune response, it may be interesting to investigate the presence of polyomavirus in these patients. The objective of this study was to identify and quantify BKV and JCV polyomavirus in saliva, oral lavage, blood and urine of patients before liver transplantation. For the study group were selected, 21 cirrhotic patients, liver transplant waiting list, of both sexes, aged over 18 and for the control group were selected 20 normorreativos patients of both sexes, older than 18 years. In these patients fluid collections were performed, urine, saliva, oral lavage and blood. After collecting and freezing the samples were carried out research of detection and quantification of human polyomavirus BK and JC subtypes using the PCR method in real time. Fifteen patients (71.42%) of GE were positive for BKV in at least one sample, but none of the patients in this group had hepatorenal syndrome. Moreover, 66.66% of patients had hepatic encephalopathy, but while 10 patients were positive for JCV, none of them has been able to quantify the viral load or the presence of virus associated with clinical disease. As regards the samples, the GE 21 (25%) were positive for BKV and 10 (11.90%) for JCV and CG 27 (34.61%) were positive for BKV and 6 (7.69%) for JCV. There was no statistically significant difference between groups ($p = 0.52$ and $p = 0.25$). The GE find an overview similar to GC concerning the presence of the virus in washed blood and urine. The major difference between samples submitted to the BKV ID saliva. Thus it was concluded that patients with cirrhosis on liver transplant waiting list do not have a higher prevalence of BKV and JCV than normorreativos

patients and complications of cirrhosis (hepatic encephalopathy and hepatorenal syndrome) are not associated with the presence of these viruses. In the oral fluid normorreactivos patients are equivalent to detection of BKV urine, saliva but is not a good fluid for detection of BKV in cirrhotics

Keywords: Liver Diseases. Cirrhotic patients. BKV. JCV. Virus.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Teste de Análise de Variância
BKV	BK vírus
CAPE	Centro de Atendimento a Pacientes Especiais
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FAM	6-carboxyfluorescein
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
G	Gramas
GC	Grupo controle
GE	Grupo de estudo
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IMT-USP Paulo	Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo
JCV	JC vírus
LEMP	Leucoencefalopatia multifocal progressiva
μM	Micrometro
ML	Mililitros
MELD	Model of end stage liver disease
NAPV	Nefropatia associada ao poliomavirus
NO	Óxido nítrico
PCR	Reação em cadeia de Polimerase
SHR	Síndrome hepatorenal
SNC	Sistema nervoso central
TAMRA	6-carboxy-tetramethylrhodamine
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
° C	Graus Celsius
®	Marca Registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	O FÍGADO	22
2.2	POLIOMAVIRUS JC E BK.....	24
2.3	IDENTIFICAÇÃO DOS POLIOMAVÍRUS.....	26
3	PROPOSIÇÃO	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1	DESENHO DO ESTUDO	29
4.2	ATENDIMENTO ÀS NORMAS DE BIOÉTICA	29
4.3	CAUSUISTICA	29
4.4	METODOLOGIA.....	30
4.4.1	Questionário	30
4.4.2	Coleta de fluidos.....	30
4.4.2.1	coleta de urina	30
4.4.2.2	coleta de saliva.....	31
4.4.2.3	coleta do lavado bucal.....	31
4.4.2.4	coleta de sangue	31
4.5	ANÁLISES LABORATORIAIS	32
4.5.1	Extração do DNA.....	33
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
5	RESULTADOS.....	35
5.1	Análise descritiva das características do GC	35
5.2	Análise descritiva das características clínicas do GE.....	35
5.3	Análise de JCV e BKV	38
6	DISCUSSÃO	44
7	CONCLUSÃO.....	47
	REFERÊNCIAS.....	48
	APÊNDICES.....	51
	ANEXOS	59

1 INTRODUÇÃO

Os poliomavirus, JC e BK, descobertos na década de 1970, têm sido relacionados com duas importantes doenças, a leucoencefalopatia multifocal progressiva (LEMP) e a nefropatia associada ao poliomavirus (NAPV), respectivamente.(Delbue et al., 2013, Hirsch et al., 2003)

Transmitidos geralmente durante a infância, permanecem latentes no adulto e podem manifestar-se clinicamente em um estado de imunossupressão severa. A depleção acentuada de linfócitos T CD4+, vinculada ao uso de imunossupressores ou associada à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), é o evento que caracteriza essa imunossupressão e que, conseqüentemente, desencadeia a LEMP e a NAPV.(Hirsch et al., 2003, Siguier et al., 2012)

Ainda que os pacientes soropositivos para o HIV, transplantados renais e portadores de esclerose múltipla tenham sido os mais afetados por esses vírus, levanta-se a possibilidade de que qualquer paciente que possua uma doença que curse com imunodeficiência, seja passível de desenvolver doenças vinculadas à infecção pelos poliomavirus.(Hirsch et al., 2003, Siguier et al., 2012)

Pacientes no pré-transplante de fígado apresentam diversas complicações da cirrose. Uma importante complicação é o hiperesplenismo, que pode resultar no sequestro de leucócitos e na conseqüente diminuição de neutrófilos e linfócitos, tornando o paciente mais suscetível a infecções pelo BK e JC. (Albillos et al., 2014)

Por outro lado, são pacientes que também podem apresentar comprometimento renal (síndrome hepatorenal) e de sistema nervoso central (encefalopatia hepática). Com complicações como essas e como esses pacientes apresentam-se com a resposta celular imune circulante comprometida, pode ser interessante investigar a presença de poliomavirus nesses pacientes. (Mitterhofer et al., 2012, Rahimi et al., 2012)

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – O FÍGADO

O fígado é um órgão nobre do corpo humano, quando existe um problema nesse órgão, teremos problemas em cascata em vários sistemas e órgãos. Suas funções incluem a manutenção da homeostase metabólica através do processamento de aminoácidos, carboidratos, lipídeos e vitaminas, metabolização de toxinas e colesterol, produção de fatores de coagulação e armazenamento de glicogênio (Heidelbaugh et al., 2006).

Danos importantes à arquitetura hepática levam à cirrose (Rahimi et al., 2012), que pode ser caracterizada como uma fibrose tecidual nodular, progressiva e difusa que leva a irregularidades nos contornos do órgão. Diversas etiologias podem causar a cirrose como abuso de álcool, infecções por vírus hepatotrópicos (C, B e D), medicações, hepatite autoimune e esteatose hepática não alcoólica (Heidelbaugh et al., 2006).

Apesar de ser uma doença silenciosa, pode apresentar alguns sinais ainda na fase assintomática como fadiga, fraqueza, e perda de peso. Quando o paciente fica descompensado e a doença torna-se sintomática, pode apresentar sintomas como sangramentos esofágicos, crises de encefalopatia e ascite. Clinicamente podemos ver ainda icterícia, coagulopatias e prurido (Heidelbaugh et al., 2006).

A progressão da cirrose pode levar o paciente ao transplante de fígado (Heidelbaugh et al., 2006). Com a finalidade de quantificar a urgência de um transplante em indivíduos com 12 anos de idade ou mais, foi desenvolvido um modelo matemático chamado de MELD (do inglês Model of end stage liver disease). O modelo leva em consideração complicações clínicas que podem ser verificadas através de exames laboratoriais (TP/INR, bilirrubinas totais e creatinina) e sua escala se estende de 6 a 40 (Heidelbaugh et al., 2006).

Nesse intervalo, entre a instalação da cirrose e o transplante hepático, os pacientes podem apresentar diversas complicações, entre elas a hipertensão portal, colaterais porto-sistêmicos, esplenomegalia, hiperesplenismo, diminuição de

componentes celulares do sangue (leucopenia, anemia), síndrome hepatorenal e encefalopatia hepática (Heidelbaugh et al., 2006).

A primeira e mais importante consequência da cirrose é a hipertensão portal, que consiste em um aumento da resistência intra-hepática e um aumento patológico do fluxo sanguíneo entre a veia porta e a veia cava inferior, aumentando o gradiente de pressão acima do seu intervalo normal (Biancofiore et al., 2012, Pinzani et al., 2011).

A pressão vascular da região porta propaga-se para a veia esplênica, aumentando o fluxo sanguíneo no baço, que, em decorrência de uma maior demanda, dilata-se (esplenomegalia) e, posteriormente, entra em colapso acelerando o sequestro de compostos celulares do sangue (hiperesplenismo).

Alguns estudos têm mostrado que a linfopenia de células T pode ser comum durante a cirrose, essa linfopenia afeta principalmente as células T auxiliares (CD4) e as células T citotóxicas (CD8). A diminuição das células T acontece independentemente da etiologia da doença (Albillos et al., 2014).

Como mecanismo compensatório adicional, para dissipar a hipertensão portal, originam-se vasos colaterais dilatados, que podem popular todo o trato gastrointestinal (colaterais porto-sistêmicos) e que, em decorrência de sua fragilidade, rompem-se com facilidade originando quadros hemorrágicos (Rahimi et al., 2012).

Outras complicações da cirrose, que apresentam consequências graves para os pacientes e levantam diversos questionamentos quanto a sua etiopatogênia, são a síndrome hepatorenal e a encefalopatia hepática (Rahimi et al., 2011).

A síndrome hepatorenal (SHR) pode ser considerada uma das complicações da cirrose que apresentam maior morbidade. É caracterizada pela diminuição da taxa de filtração glomerular e do fluxo sanguíneo renal, que contribuem para a elevação plasmática dos níveis de compostos nitrogenados (Biancofiore et al., 2012, Heidelbaugh et al., 2006).

Divide-se em dois tipos que possuem diferentes cursos clínicos e fisiopatologias. Enquanto o tipo 1 se desenvolve depois de uma efetiva redução do volume de sangue arterial, o tipo 2 se desenvolve devido a um desarranjo hemodinâmico encontrado ao final da doença de fígado com ascite refrataria (Egerod Israelsen et al., 2015).

Estima-se que diversos fatores estejam associados à disfunção renal na cirrose. Mas o principal fator são as mudanças hemodinâmicas que se encontram

nos pacientes com cirrose, ascite e hipertensão portal (Egerod Israelsen et al., 2015).

A encefalopatia hepática é uma síndrome neuropsiquiátrica que pode se desenvolver na insuficiência hepática. É uma das mais frequentes complicações, afetando até um terço dos pacientes com cirrose hepática (Romero-Gomez et al., 2015, Wright et al., 2007). Na cirrose ocorre de forma insidiosa com amplos distúrbios neuropsiquiátricos como a disfunção psicomotora com diminuição da memória, do tempo de reação e da atenção, além de alterações de sensibilidade e falta de concentração (Wright et al., 2007).

Atualmente algumas hipóteses têm sido consideradas como as principais, no desenvolvimento da encefalopatia hepática, como o acúmulo de amônia e ureia. As mudanças de neurotransmissão induzida por estes compostos têm um papel importante no desenvolvimento dos distúrbios neurológicos apresentados por alguns pacientes (Mas, 2006).

A encefalopatia hepática e a síndrome hepatorenal ainda não possuem um fator etiológico definido e é possível que agentes infecciosos também possam fazer parte do desenvolvimento dessas doenças. Alguns autores levantaram recentemente a hipótese de participação de um poliomavírus no desenvolvimento da SHR (Mitterhofer et al., 2012).

2.2 – POLIOMAVIRUS BK e JC

Os poliomavirus são pequenos, não envelopados, com dupla fita de DNA (Jiang et al., 2009). Fazem parte de um subgrupo pertencente à família Papoviridae, que incluem o BK vírus (BKV) e o JC virus (JCV). Os humanos são hospedeiros naturais desses vírus, que recebem esses nomes devido as iniciais dos primeiros pacientes em que o vírus foi isolado, por volta da década de 1970 (Hirsch et al., 2003, Pinto et al., 2014).

A contaminação ocorre na infância, entre três e quatro anos de idade com o BKV e entre dez e quinze anos de idade com o JCV (Siguier et al., 2012).

Ainda que não esteja completamente definida a pré - infecção, a transmissão pode ocorrer por diversas vias como a respiratória, oral-fecal, sexual, transfusão de

sangue, trans-placentária e através do transplante de órgãos (Pinto et al., 2014, Siguier et al., 2012).

A soroprevalência do BKV é muito alta em adultos, cerca de 90% da população, já para o JCV entre 50 a 80% dos adultos. Alguns estudos mostraram que conforme a idade aumenta os anticorpos para BKV diminuem, enquanto os anticorpos para JCV, permanecem inalterados (Knowles, 2006).

O BKV e o JCV não são patogênicos para indivíduos imunocompetentes, sendo a infecção primária normalmente assintomática, tornando-se sintomática, em estados de imunossupressão (induzida por doenças ou por drogas), na reativação da infecção latente (Hirsch et al., 2003, Machado et al., 2011, Siguier et al., 2012). Acredita-se que a reativação dos vírus está mais associada com o grau de imunossupressão do paciente principalmente no Tx renal, do que com o tipo de terapia imunossupressora que esse paciente está recebendo (Pinto et al., 2014).

A infecção pelo BKV, quando reativada durante episódios de imunossupressão, pode levar a doenças do trato urinário como a cistite hemorrágica e a nefropatia por poliomavírus (NAPV) (Hirsch et al., 2003, Mitterhofer et al., 2012).

A NAPV tem sido relacionada 1 a 5% dos receptores de transplante renal e está associada a 50% das perdas dos transplantes (Hirsch, 2002). Oitenta por cento dos adultos que desenvolvem NAPV são soropositivos para o BKV antes do transplante (Hirsch, 2002) e na maioria das vezes a reativação viral ocorre no primeiro ano pós-transplante (Hirsch et al., 2003).

Alguns métodos laboratoriais podem ser rotineiramente utilizados para pesquisar a replicação do BKV como a citologia de amostras de urina, e a Reação em cadeia de Polimerase (PCR) em amostras de urina e sangue. Esses métodos de *screening* têm possibilitado o diagnóstico precoce da NAPV, aumentando a taxa de sucesso no tratamento destes casos (Hirsch et al., 2003).

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. Esse estudo 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, além de sugerir a possibilidade de transmissão por via oral (Jeffers et al., 2009).

Um estudo observou a presença do DNA dos poliomavírus BKV e JCV, nas amostras de saliva de crianças tanto HIV positivas quanto normorreativas, com a

frequência de infecção significativamente maior no grupo de crianças HIV positivas (Robaina et al., 2013).

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, 2002).

A primeira vez que o JCV foi descrito, foi em 1971 por Padgett (Padgett et al., 1971), que isolou o vírus a partir do cérebro de um paciente que veio a óbito por leucoencefalopatia multifocal progressiva (LEMP) (Delbue et al., 2013).

A LEMP é uma doença rara, que pode ser fatal, ocorre em pacientes HIV positivos, com neoplasias de órgãos sólidos, doenças hematológicas malignas, transplantados de órgãos, portadores de esclerose múltipla e em pacientes sob tratamento imunossupressor (Delbue et al., 2013). É caracterizada por desmielinização progressiva da substância branca no sistema nervoso central (SNC), sintomas de deterioração cognitiva, distúrbios da marcha e coordenação, e pode levar o paciente ao óbito (Hirsch et al., 2013, Pinto et al., 2014).

Além de presente no SNC, em 70% dos pacientes, o JCV pode ser encontrado, na forma latente, em tecido renal de adultos saudáveis. Além do rim acredita-se que existam outros reservatórios do vírus como linfócitos B, medula óssea e células epiteliais (Jeffers et al., 2009, Robaina et al., 2013).

2.3 – IDENTIFICAÇÃO DOS POLIOMAVIRUS

A identificação dos poliomavirus humanos é realizada, quase sempre, em sangue ou em urina, através da quantificação da carga viral. Por outro lado, recentemente, dois trabalhos identificaram a saliva como um bom fluído para a detecção desses vírus (Jeffers et al., 2009, Robaina et al., 2013).

Esse interesse na crescente utilização da saliva e outras amostras orais para o diagnóstico de doenças orais e sistêmicas reside principalmente na forma de coleta, que é simples, rápida e não invasiva (Malamud, 2011, Mitterhofer et al., 2012).

A detecção do HPV (papiloma vírus humano) em amostras de saliva tem sido utilizada, para amplificação de DNA do HPV por PCR, e esta metodologia também tem sido utilizado para detectar diferentes tipos de HPV. Os anticorpos contra o HPV foram simultaneamente testados no soro, saliva e amostras de lavados orais, produzindo resultados promissores quando se usa esses fluidos.(Malamud, 2011)

Novas modalidades de coleta como o lavado bucal, associadas a técnicas biomoleculares como a PCR, tem mostrado resultados muitos específicos e sensíveis, tanto quanto os resultados que são obtidos por meio de amostras de sangue e urina (Johnson et al., 2011, Malamud, 2011, Mitterhofer et al., 2012). A execução do lavado bucal com Listerine® (Johnson & Johnson do Brasil Indústria e Comércio de Produtos para Saúde Ltda) é adequada para a obtenção de amostras para a quantificação do DNA dos vírus através da PCR, permitindo boa quantidade de amplificação do DNA (Heath et al., 2001).

Como o BKV e o JCV estão vinculados à falha renal e à encefalopatia, na vigência de imunodepressão, e essas complicações fazem parte do espectro clínico do paciente no pré-transplante de fígado, é possível que exista uma participação desses vírus no desenvolvimento dessas condições e que a saliva seja um fluido viável para a identificação desses vírus.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi identificar e quantificar os poliomavirus BKV e JCV em saliva, lavado, sangue e urina, de pacientes no pré-transplante de fígado.

Comparar os fluidos já citados entre os pacientes em pré transplante de fígado e pacientes normoreativos.

Identificar se os poliomavirus estão relacionados com as complicações encontradas na cirrose (encefalopatia hepática e síndrome hepatorrenal)

Demonstrar que a saliva e o lavado são fluidos tão eficientes para a identificação

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Foi executado um estudo observacional de caso-controle.

4.2 ATENDIMENTO ÀS NORMAS DE BIOÉTICA

Esta pesquisa foi aprovada 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 (Apêndice A) foi aplicado a todos os indivíduos que aceitaram participar da pesquisa, antes do início das coletas.

4.3 CASUÍSTICA

Para este estudo foi utilizada uma amostra de conveniência composta por 41 pacientes, divididos em grupo de estudo (GE) e grupo controle (GC).

Para compor o GE foram selecionados, consecutivamente, 21 pacientes do Centro de Atendimento a Pacientes Especiais (CAPE) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP). Os seguintes critérios de inclusão foram utilizados para compor o GE: pacientes cirróticos, em fila de transplante de fígado, de ambos os sexos, com idade superior a 18 anos.

O GC foi composto por 20 pacientes normorreativos, de ambos os sexos, maiores de 18 anos, que foram selecionados entre os funcionários, professores do

Departamento de Estomatologia da FOUSP e alunos do curso de atualização e de pós-graduação do CAPE.

4.4 METODOLOGIA

Aos pacientes, que aceitaram participar da pesquisa e assinaram o TCLE, foi aplicado um questionário (Apêndice B e C). Após o preenchimento do questionário foram realizadas as coletas de fluídos (urina, saliva, lavado bucal, e sangue).

4.4.1 Questionário

O pesquisador preencheu um questionário com a história médica pregressa do paciente do GE (Apêndice A) com informações obtidas através do prontuário e questionamentos feitos diretamente ao paciente como dados demográficos (sexo e idade), hábitos (tabagismo e etilismo), data do diagnóstico da cirrose, MELD, comorbidades, complicações da cirrose, medicação em uso e resultados de exames laboratoriais recentes (Apêndice B).

O questionário aplicado aos pacientes do GC (Apêndice C) tinha o objetivo principal de identificar doenças sistêmicas crônicas que pudessem refletir algum grau de imunocomprometimento, além de colher dados demográficos (sexo, idade) e hábitos (tabagismo e etilismo).

4.4.2 Coletas de Fluídos

As coletas de todos os pacientes foram realizadas na mesma ordem: saliva, lavado bucal, sangue e urina.

4.4.2.1 coleta de urina

Para a coleta de urina foi utilizado um frasco estéril. O paciente foi encaminhado até o banheiro e instruído a desprezar o primeiro jato da urina no vaso sanitário, coletar no frasco estéril o segundo jato, (até a metade do frasco) desprezando o restante da micção no vaso sanitário. A urina foi armazenada e congelada em freezer a -20° C.

4.4.2.2 coleta de saliva

A coleta da saliva total não estimulada foi realizada em todos os indivíduos de ambos os grupos para a detecção do BKV e JCV. O indivíduo foi orientado a cuspir em um tubo coletor tipo Falcon. A saliva relativa ao primeiro minuto foi descartada. As coletas foram realizadas em sala ventilada e iluminada. O volume de 5ml da amostra salivar obtida foi armazenada e congelada em freezer a -20° C.

4.4.2.3 coleta do lavado bucal

A coleta do lavado bucal foi realizada em todos os indivíduos de ambos os grupos para a detecção do BKV e JCV. As coletas foram realizadas em sala ventilada e iluminada. Os pacientes foram instruídos a realizar um bochecho com 10 ml de Listerine® por 30 segundos e depositar o líquido bochechado em tubo coletor tipo Falcon de 50 ml. Esse tubo foi identificado e congelado em freezer a -20° C para posterior análise.

4.4.2.4 coleta de sangue

As amostras de sangue foram coletadas dos indivíduos do GE e GC a partir de punções realizadas nas veias mediana, basílica ou cefálica. O braço foi garroteado 5 cm acima do local da coleta. Foi escolhida a veia mais proeminente

através da palpação e realizada assepsia local com álcool a 70%. A coleta foi realizada com scalp 25g conectado a um tubo coletor com ativador de coágulo de 4ml.

O material colhido permaneceu em repouso por 30 minutos, posteriormente foi centrifugado durante 15 minutos em 3000 rotações por minutos. O soro foi separado com a utilização de pipeta e colocado em eppendorf. Tanto o soro em eppendorf quanto o tubo com o sangue total foram identificados e congelados em freezer a -20°C.

4.5 ANÁLISES LABORATORIAIS

Após a coleta e congelamento das amostras de soro, saliva, lavado bucal 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).

O protocolo escolhido para a reação de PCR em tempo real foi descrito por Pal et al. (2006) e utiliza *primers* e sondas específicas para o gene que codifica o Ag-T dos poliomavírus JC e BK originando um fragmento de 80pb (Quadro 4.1).

Quadro 4.1 Oligonucleotídeos e sonda responsáveis pela amplificação dos fragmentos no sistema de qPCR.

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

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®*).

Na reação final, foram utilizados controles tanto negativos (água) quanto controles positivos (DNA extraído de amostras clínicas avaliadas anteriormente positivas para BK e JC). O limite de detecção para o BKV foi de 1000 cópias/ml e para o JCV de 600 cópias/ml.

4.5.1 – Extração do DNA

Para a extração do DNA das amostras foi utilizado a máquina Nuclisens – Easymag Biomerieux®, onde a extração automatizada de ácidos nucleicos foi realizada através de partículas de sílica magnetizadas.

Fig. 1 – Princípio da extração de DNA

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os participantes foram identificados por um número em ordem de atendimento, de 1 a 20 e divididos em GE e GC. Todos os dados dos pacientes foram registrados em uma base de dados desenvolvida no programa Epi InfoTM. Os resultados e dados obtidos foram analisados com auxílio do mesmo programa. Os grupos foram comparados quanto à presença e quantidade de poliomavirus BKV e JCV nos diferentes fluídos colhidos e com suas características clínicas. O teste de Bartlett, foi realizado para verificar a homogeneidade nas variâncias ($p > 0,05$). Para variáveis com distribuição normal, foi aplicado o Teste de Análise de Variância (ANOVA). Para variáveis sem distribuição normal foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. O nível de significância estabelecido foi 0,05 ou 5%.

5 RESULTADOS

A análise dos dados demográficos revelou que os grupos apresentaram-se semelhantes quanto a idade ($p=0,12$), mas diferentes quanto ao sexo ($p=0,0012$).

5.1 ANÁLISE DESCRITIVA DAS CARACTERÍSTICAS DO GC

No GC a média de idade foi de 48 anos (mínimo de 28 anos; máximo de 62 anos; desvio padrão de 9,49). Com relação ao sexo, 14 (70%) pacientes eram do sexo feminino e 6 (30%) do sexo masculino.

5.2 ANÁLISE DESCRITIVA DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DO GE

Dos 21 pacientes do GE, 4 (19,05%) eram do sexo feminino e 17 (80,95%) eram do sexo masculino e a média de idade foi de 53 anos (mínimo de 35 anos; máximo de 65 anos; desvio padrão de 8,39).

O tempo médio de diagnóstico desses pacientes foi de 5,1 anos (mínimo de 1; máximo de 16; desvio padrão de 3,95) e a média do MELD foi 19 (mínimo de 12; máximo de 30; desvio padrão de 4,73).

As causas mais comuns da cirrose estão descritas na tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Causas da cirrose

CAUSAS DA CIRROSE	Frequência	Porcentagem	Percentual cumulativo
ALCOÓLICA	7	33,33%	33,33%
HEPATITE AUTOIMUNE	1	4,76%	38,10%
CIRROSE BILIAR PRIMÁRIA	1	4,76%	42,86%
CRIOGÊNICA	4	19,05%	61,90%
HEPATITE B	1	4,76%	66,67%
HEPATITE C	7	33,33%	100,00%
Total	21	100,00%	100,00%

As complicações da cirrose mais comuns foram a hipertensão portal (100%), os colaterais porto sistêmicos (95,23%), o hiperesplenismo (95,23%) e a plaquetopenia (80,95%) (Tabela 5.2). A ascite e a encefalopatia hepática figuram como duas das complicações mais graves sendo que 18 pacientes (85,71%) apresentavam pelo menos uma dessas complicações. Algum grau de deficiência imunológica circulante foi encontrado em 11 pacientes (61,11%).

Tabela 5.2 - Complicações da Cirrose

Complicações da cirrose	N	%
Hipertensão portal	21	100%
Colaterais porto sistêmicos	20	95,23%
Hiperesplenismo	20	95,23%
Plaquetopenia	17	80,95%
Ascite	16	76,19%
Hemorragia digestiva alta	14	66,66%
Encefalopatia hepática	14	66,66%
Anemia	13	61,90%
Leucopenia	9	42,85%
Linfopenia	9	42,85%
Neutropenia	4	19,04%
Peritonite bacteriana	1	4,76%

As comorbidades mais encontradas foram o carcinoma hepatocelular (33%) e o diabetes (33,33%) (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 - Comorbidades encontradas nos pacientes cirróticos

Comorbidades	N	%
Carcinoma hepatocelular	7	33,33%
Nefropatia	1	4,76%
Cardiomiopatia	1	4,76%
Diabetes	7	33,33%

Os pacientes do GE executavam exames laboratoriais periódicos para controle da cirrose e classificação MELD. Foram coletadas as informações de exames que pudessem influenciar a presença e quantificação dos poliomavirus, como o hemograma completo (que pode avaliar imunidade celular circulante) e a ureia e a creatinina (que avaliam a função renal). Os dados estão dispostos na tabela 5.4.

Tabela 5.4 - Exames laboratoriais

Exames laboratoriais	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão	Valores de referência
Plaquetas (n=18)	24.000	150.000	64.166	30592	150.000–450.000
Ureia (n=3)	26	119	57,66	53,12	10 - 40
Creatinina (n=18)	0,50	8,20	1,22	3,13	0,6-1,2
Hemoglobina (n=18)	8,80	14,50	11,80	1,84	13,50–17,50
Leucócitos (n=18)	1690	5870	3978,94	1451,77	3500–10500
Neutrófilos (n=18)	1110	5630	2659,05	1159,16	1700–8000
Linfócitos (n=18)	340	2760	1078	679,33	900-2900

5.3 ANÁLISE DE JCV E BKV

Ao total foram coletadas 162 amostras (84 no GE e 78 no GC) para identificação e quantificação de JCV e BKV, sendo 41 amostras de saliva, 41 amostras de lavado bucal, 41 amostras de soro e 39 amostras de urina (dois pacientes do GC não coletaram amostra de urina).

Dos 21 indivíduos do GE, 15 (71,42%) foram positivos para o BKV em pelo menos uma das amostras analisadas e 10 (47,61%) positivos para o JCV. Nos 20 pacientes do GC 14 (70%) foram positivos para BKV e 6 para JCV (30%).

Quanto às amostras, no GE, 21 (25%) foram positivas para BKV e 10 (11,90%) para JCV e no GC 27 (34,61%) foram positivas para BKV e 6 (7,69%) para JCV. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,52$ e $p=0,25$).

Apenas um paciente do GE apresentou nefropatia, mas essa condição era prévia à cirrose. Esse paciente apresentava-se positivo para o BKV em soro e urina.

O JCV apresentou-se positivo em 3 amostras de lavado e 7 de urina do GE e em 6 amostras de urina do GC.

No GE, dos 10 pacientes positivos para o JCV, 8 apresentavam encefalopatia hepática ($p=0,43$). Salienta-se que 6 pacientes com encefalopatia hepática não apresentavam positividade para o JCV em nenhum dos fluídos. Sete pacientes do GE não apresentaram encefalopatia, desses 2 eram positivos para o JCV e 5 eram negativos.

No GE o BKV foi identificado em maior quantidade nas amostras de lavado e urina ($p = 0,009$) e no GC em saliva e lavado ($p=0,062$) (Tabela 5.5).

Tabela 5.5 - Análise entre os fluidos no grupo de estudo (GE) e no grupo controle (GC)

Saliva BK		Soro BK	Lavado BK	Urina BK	P
Grupo Estudo					
Positivo	1	3	8	9	0,009
Negativo	20	18	13	12	
Grupo Controle					
Positivo	10	3	9	5	0,062
Negativo	10	17	11	15	

Como o lavado e a urina apresentaram as maiores quantidades de amostras positivas no GE, esses fluidos foram comparados separadamente com os demais. A positividade para o BKV no lavado e na urina mostrou-se estatisticamente mais prevalente do que em saliva ($p=0,024$ e $p=0,011$, respectivamente) (Tabelas 5.6; 5.7; 5.8 e 5.9).

Tabela 5.6 - Associação entre a saliva e lavado com relação a detecção do BKV no GE

	Saliva BK	Lavado BK	P
Positivo	1	8	0,024
Negativo	20	13	

Tabela 5.7 - Associação entre a saliva e urina com relação a detecção do BKV no GE

	Saliva BK	Urina BK	P
Positivo	1	9	0,011
Negativo	20	12	

Tabela 5.8 - Associação entre a soro e urina com relação a detecção do BKV no GE

	Soro BK	Urina BK	P
Positivo	3	9	0,087
Negativo	18	12	

Tabela 5.9 - Associação entre a soro e lavado com relação a detecção do BKV no GE

	Soro BK	Lavado BK	P
Positivo	3	8	0,160
Negativo	18	13	

As diferenças encontradas entre as prevalências de saliva e soro e de lavado e urina não foram estatisticamente significantes (Tabelas 5.10 e 5.11).

Tabela 5.10 - Associação entre a saliva e soro com relação a detecção do BKV no GE

	Saliva BK	Soro BK	P
Positivo	1	3	0,599
Negativo	20	18	

Tabela 5.11 - Associação entre a lavado e urina com relação a detecção do BKV no GE

	Lavado BK	Urina BK	P
Positivo	8	9	1
Negativo	13	12	

Na comparação das amostras do grupo controle a positividade do BKV foi mais prevalente em saliva, mas essa prevalência foi estatisticamente significativa apenas na comparação entre saliva e soro ($p=0,04$) (Tabelas 5.12; 5.13; 5.14; 5.15; 5.16 e 5.17)

Tabela 5.12 - Associação entre a saliva e soro com relação a detecção do BKV no GC

	Saliva BK	Soro BK	P
Positivo	10	3	0,04
Negativo	10	17	

Tabela 5.13 - Associação entre a saliva e urina com relação a detecção do BKV no GC

	Saliva BK	Urina BK	P
Positivo	10	5	0,19
Negativo	10	15	

Tabela 5.14 - Associação entre a saliva e lavado com relação a detecção do BKV no GC

	Saliva BK	Lavado BK	P
Positivo	10	9	1
Negativo	10	11	

Tabela 5.15 - Associação entre a soro e lavado com relação a detecção do BKV no GC

	Soro BK	Lavado BK	P
Positivo	3	9	0,08
Negativo	17	11	

Tabela 5.16 - Associação entre a soro e urina com relação a detecção do BKV no GC

	Soro BK	Urina BK	P
Positivo	3	5	0,692
Negativo	17	15	

Tabela 5.17 - Associação entre a lavado e urina com relação a detecção do BKV no GC

	Lavado BK	Urina BK	P
Positivo	9	5	0,319
Negativo	11	15	

Na análise comparativa entre os grupos GE e GC apenas a saliva apresentou-se com uma prevalência maior de BKV nos pacientes do GC ($p=0,0017$) (Tabela 5.18).

Figura 5.18 - Análise de amostras positivas de BKV e JCV nos grupos de estudo (GE) e controle (GC), segundo o tipo de fluído analisado

	SALIVA (BKV)			SORO (BKV)			LAVADO (BKV)			URINA (BKV)		
	N (%)			N (%)			N (%)			N (%)		
	GE	GC	P	GE	GC	P	GE	GC	P	GE	GC	P
POSITIVO	1	10		3	3		8	9		9	5	
	(4,76)	(47,61)		(14,28)	(14,28)		(38,09)	(42,85)		(42,85)	(23,80)	
NEGATIVO	20	11	0,0017	18	18	0,9491	13	12	0,7521	12	6	0,4675
	(95,23)	(52,38)		(85,71)	(85,71)		(61,90)	(57,14)		(57,14)	(28,57)	

As médias de carga viral para o BKV foram maiores no GE em todos os fluídos analisados (Tabelas 5.19 e 5.20). O limite de detecção para o BKV foi estabelecido em 1000 cópias/ml.

5.19 - Carga viral do BKV nos pacientes do GE

Fluido	Mínimo	Máximo	Media	Média Log ²	Mediana	Desvio Padrão
Lavado (8)	1660	14662	7087,12	12,790	5769	4935,08
Saliva (1)	3785	3785	3785	-	3785	-
Soro (3)	2306	7878	4168,66	12,025	2322	3212,38
Urina (8)	1695	73035	18026,62	14,137	4988	25272,89

5.20 - Carga viral do BKV nos pacientes do GC

Fluido	Mínimo	Maximo	Media	Média Log ²	Mediana	Desvio Padrão
Lavado (6)	1116	4144	2767,16	11,434	3096,500	1288,54
Saliva (9)	1131	7398	3421,11	11,740	3518	2311,98
Soro (3)	1936	7094	3660	11,837	1950	2973,93
Urina (4)	1375	24579	9843,25	13,264	6709,50	10432,90

O limite de detecção do JCV foi estabelecido em 600 cópias/ml, mas apenas dois pacientes apresentaram cargas virais quantificáveis (ambos do grupo controle e ambos em urina).

Tanto no GE quanto no GC não existiu concordância para a presença de BKV ou JCV nos diferentes fluídos (saliva, lavado, soro e urina) de um mesmo paciente (Apêndice D).

Ao término da pesquisa, dos 21 pacientes do GE, 10 (47,6%) foram transplantados, 9 (42,8%) seguiam em fila de transplante e 2 (9,5%) faleceram.

6 DISCUSSÃO

O JCV e o BKV são poliomavírus que foram descobertos na década de 1970 e as doenças vinculadas a eles (PVAN e LEMP) têm sido associadas a estados de imunodepressão severos causados por drogas ou doenças.

Uma das motivações para a execução deste trabalho é o fato de que pacientes cirróticos em fila de transplante apresentam distúrbios imunológicos com comprometimento da função imune causados, particularmente, por um desequilíbrio de subpopulações de células T periféricas circulantes (Lombardo et al., 1995). Essa característica poderia torna-los mais susceptíveis à reativação da infecção latente e ao aumento da replicação viral que, teoricamente, poderia estar vinculado ao desencadeamento das doenças relacionadas a estes vírus (Pinto et al., 2014).

Ainda que a maioria dos pacientes do presente estudo tenha apresentado diminuição da contagem de neutrófilos, linfócitos ou leucócitos, essa alteração não era quantitativamente expressiva. Esse fato provavelmente reflete-se na quantidade de carga viral do BKV encontrada no grupo de estudo. As cargas virais apresentaram-se maiores no GE do que no GC, mas essa diferença foi pequena e não se apresentou relevante. O JCV não pode ser quantificado em nenhum dos pacientes do GE.

É provável que as doenças vinculadas ao BKV e JCV estejam associadas a uma deficiência imune específica, como a depleção de células T CD4+, que acontece em pacientes HIV+ com LEMP e em pacientes transplantados renais (em decorrência dos imunossupressores utilizados) (Jiang et al., 2009).

A hipótese formulada previamente de que poderia haver uma associação entre BKV e JCV com síndrome hepatorenal e encefalopatia hepática, respectivamente, não pode ser confirmada. Quinze pacientes (71,42%) do GE apresentaram-se positivos para o BKV em pelo menos uma amostra, mas nenhum dos pacientes desse grupo apresentou síndrome hepatorenal. Por outro lado, 66,66% desses pacientes apresentaram encefalopatia hepática, mas, apesar de 10 pacientes serem positivos para o JCV, em nenhum deles foi possível quantificar a carga viral ou associar a presença do vírus com a doença clínica.

O principal objetivo deste trabalho foi identificar o BKV e JCV em diversos fluídos. Normalmente as pesquisas tem buscado identificar e quantificar esses vírus

em sangue e em urina. Poucos trabalhos utilizaram a saliva, mas nenhum comparou as amostras de saliva com amostras de outros fluídos (como sangue e urina). A comparação entre fluídos na literatura restringe-se a sangue e urina.

Neste estudo, como a quantidade de amostras positivas para o JCV foi muito baixa, foi executada apenas a avaliação do BKV.

Foram utilizadas amostras de sangue, urina, saliva e lavado para a identificação do vírus. Saliva e lavado podem parecer amostras similares, mas estudos anteriores demonstraram uma eficiência maior na detecção de papiloma vírus humano em lavado (Fatahzadeh et al., 2013). Essa eficiência estaria vinculada ao fato de que o lavado seria capaz de coletar células esfoliadas de toda a cavidade oral, aumentando a quantidade de células epiteliais presentes na amostra (Fatahzadeh et al., 2013). Outra vantagem da técnica seria a presença de álcool na formulação do enxaguatório, que teria a capacidade de fixar melhor as células descamadas do epitélio.

Ao avaliar o GC neste estudo foi possível verificar que não havia diferença estatisticamente significativa na detecção de BKV nos diferentes fluídos analisados. A saliva e o lavado apresentaram o maior índice de detecção do vírus e níveis muito semelhantes de detecção. Este achado confirma pesquisas prévias que sugeriram que a saliva pode ser uma rota de transmissão do BKV e a cavidade bucal pode ser um sítio de replicação viral (Robaina et al., 2013). A prevalência de detecção em saliva e lavado não se apresentou estatisticamente diferente da encontrada em urina, o que pode levar a hipótese de que esses fluídos podem ser tão eficientes quanto a urina na identificação do BKV. A detecção de BKV no soro de pacientes normorreativos sugere a viremia pode ocorrer na ausência de doença clínica.

No GE encontramos um panorama semelhante ao GC, referente a presença do vírus em lavado, sangue e urina. A maior diferença entre as amostras apresentou-se na identificação do BKV em saliva. Apenas um paciente apresentou o BKV em saliva e 8 apresentaram amostras positivas de lavado. Uma diferença expressiva e significativa. Talvez essa diferença possa ser explicada pela condição clínica dos pacientes com cirrose e pelos diferentes tipos de coleta de fluído.

Pacientes cirróticos em fila de transplante de fígado e, particularmente os que apresentam encefalopatia hepática, apresentam um acúmulo de compostos nitrogenados circulantes e em saliva (amônia e óxido nítrico) (Bajaj et al., 2015). O aumento de óxido nítrico (NO) leva ao aumento da toxicidade endógena e, como

consequência, uma diminuição da taxa autóctone de microorganismos da boca (Bajaj et al., 2015). Por causa de sua função microbicida, NO tem sido frequentemente considerado um mediador protetor em infecções virais (Uehara et al., 2015). Em geral, a modificação de proteínas pelo NO afeta a replicação viral. Exemplos dessa ação foram descritos no coxsackievirus, onde a nitrosilação da protease diminui a atividade enzimática e interrompe o ciclo viral, e no vírus da imunodeficiência humana (HIV) inibindo a transcriptase reversa e a replicação viral (Uehara et al., 2015).

Por outro lado, a coleta do lavado bucal recrutaria uma maior quantidade de células descamadas aumentando a taxa de detecção viral. O Listerine®, por sua vez, atuaria reduzindo a quantidade de NO na saliva (Woessner et al., 2016).

Assim, postula-se que o NO presente na saliva atuaria contra partículas virais livres e os vírus intracelulares, mais protegidos que os livres, seriam identificados através da técnica utilizada na coleta do fluido.

A única diferença encontrada na comparação entre os grupos foi na presença de BKV na saliva. Atribui-se a essa diferença encontrada o mesmo mecanismo envolvido com a produção de NO. Assim a saliva não seria um fluido adequado para a detecção do BKV em pacientes cirróticos.

Outra característica que os dois grupos compartilhavam era a falta de correlação entre os diferentes fluidos. Assim, a detecção do BKV em um determinado fluido não garantia a positividade em outros fluidos.

Essa falta de correlação pode apontar para a presença de reservatórios diferentes e independentes do BKV.

7 CONCLUSÃO

Pacientes cirróticos em fila de transplante hepático não apresentam maior prevalência de BKV ou JCV do que pacientes normorreativos e as complicações da cirrose (encefalopatia hepática e síndrome hepatorenal) não estão associadas à presença desses vírus. Neste estudo em pacientes normorreativos os fluídos bucais são equivalentes a urina na detecção do BKV, mas a saliva não é um bom fluido para detecção do BKV em pacientes cirróticos.

REFERÊNCIAS¹

Albillos A, Lario M, Alvarez-Mon M. Cirrhosis-associated immune dysfunction: distinctive features and clinical relevance. *J Hepatol*. 2014 Dec; 61(6):1385-96. doi: 10.1016/j.jhep.2014.08.010.

Bajaj JS, Betrapally NS, Hylemon PB, Heuman DM, Daita K, White MB, et al. Salivary microbiota reflects changes in gut microbiota in cirrhosis with hepatic encephalopathy. *Hepatology*. 2015 Oct; 62(4):1260-71. doi: 10.1002/hep.27819.

Biancofiore G, Auzinger G, Mandell S, Della Rocca G. Liver cirrhosis in the medical critical care patient. *Minerva Anestesiol*. 2012 Jun; 78(6):693-703. doi:

Delbue S, Ferraresso M, Ghio L, Carloni C, Carluccio S, Belingheri M, et al. A review on JC virus infection in kidney transplant recipients. *Clin Dev Immunol*. 2013; 2013:926391. doi: 10.1155/2013/926391.

Egerod Israelsen M, Gluud LL, Krag A. Acute kidney injury and hepatorenal syndrome in cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015 Feb; 30(2):236-43. doi: 10.1111/jgh.12709.

Fatahzadeh M, Schlecht NF, Chen Z, Bottalico D, McKinney S, Ostoloza J, et al. 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. doi: 10.1016/j.oooo.2012.11.004.

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. doi: 10.1043/0003-9985(2001)125<0127:UOBCCI>2.0.CO;2.

Heidelbaugh JJ, Bruderly M. Cirrhosis and chronic liver failure: part I. Diagnosis and evaluation. *Am Fam Physician*. 2006 Sep 1; 74(5):756-62. doi:

Heidelbaugh JJ, Sherbondy M. Cirrhosis and chronic liver failure: part II. Complications and treatment. *Am Fam Physician*. 2006 Sep 1; 74(5):767-76. doi:

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

Hirsch HH, Kardas P, Kranz D, Leboeuf C. The human JC polyomavirus (JCPyV): virological background and clinical implications. *APMIS*. 2013 Aug; 121(8):685-727. doi: 10.1111/apm.12128.

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

Jeffers LK, Madden V, Webster-Cyriaque J. BK virus has tropism for human salivary gland cells in vitro: implications for transmission. *Virology*. 2009 Nov 25; 394(2):183-93. doi: 10.1016/j.virol.2009.07.022.

Jiang M, Abend JR, Johnson SF, Imperiale MJ. The role of polyomaviruses in human disease. *Virology*. 2009 Feb 20; 384(2):266-73. doi: 10.1016/j.virol.2008.09.027.

Johnson NW, Malamud D, Reznik D, Speicher DJ, Phelan J. Mucosal fluids and biomarkers of clinical disease: workshop 3B. *Adv Dent Res*. 2011 Apr; 23(1):137-41. doi: 10.1177/0022034511400078.

Knowles WA. Discovery and epidemiology of the human polyomaviruses BK virus (BKV) and JC virus (JCV). *Adv Exp Med Biol*. 2006; 577:19-45. doi: 10.1007/0-387-32957-9_2.

Lombardo L, Capaldi A, Poccardi G, Vineis P. Peripheral blood CD3 and CD4 T-lymphocyte reduction correlates with severity of liver cirrhosis. *Int J Clin Lab Res*. 1995; 25(3):153-6. doi:

Machado DM, Fink MC, Pannuti CS, Succi RC, Machado AA, Carmo FB, et al. 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. doi:

Malamud D. Saliva as a diagnostic fluid. *Dent Clin North Am*. 2011 Jan; 55(1):159-78. doi: 10.1016/j.cden.2010.08.004.

Mas A. Hepatic encephalopathy: from pathophysiology to treatment. *Digestion*. 2006; 73 Suppl 1:86-93. doi: 10.1159/000089783.

Mitterhofer AP, Tinti F, Umbro I, Pietropaolo V, Fiacco F, Bellizzi A, et al. Polyomavirus BK infection before liver transplantation in patients with chronic kidney disease. *Transplant Proc*. 2012 Sep; 44(7):1934-7. doi: 10.1016/j.transproceed.2012.06.052.

Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet*. 1971 Jun 19; 1(7712):1257-60. doi:

Pinto M, Dobson S. BK and JC virus: a review. *J Infect*. 2014 Jan; 68 Suppl 1:S2-8. doi: 10.1016/j.jinf.2013.09.009.

Pinzani M, Rosselli M, Zuckermann M. Liver cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2011 Apr; 25(2):281-90. doi: 10.1016/j.bpg.2011.02.009.

Rahimi RS, Rockey DC. Complications and outcomes in chronic liver disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2011 May; 27(3):204-9. doi: 10.1097/MOG.0b013e3283460c7d.

Rahimi RS, Rockey DC. Complications of cirrhosis. *Curr Opin Gastroenterol*. 2012 May; 28(3):223-9. doi: 10.1097/MOG.0b013e328351d003.

Robaina TF, Mendes GS, Benati FJ, Pena GA, Silva RC, Montes MA, et al. Shedding of polyomavirus in the saliva of immunocompetent individuals. *J Med Virol*. 2013 Jan; 85(1):144-8. doi: 10.1002/jmv.23453.

Robaina TF, Mendes GS, Benati FJ, Pena GA, Silva RC, Montes MA, et al. Polyomavirus in saliva of HIV-infected children, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2013 Jan; 19(1):155-7. doi: 10.3201/eid1901.120563.

Romero-Gomez M, Montagnese S, Jalan R. Hepatic encephalopathy in patients with acute decompensation of cirrhosis and acute-on-chronic liver failure. *J Hepatol*. 2015 Feb; 62(2):437-47. doi: 10.1016/j.jhep.2014.09.005.

Siguié M, Sellier P, Bergmann JF. BK-virus infections: a literature review. *Med Mal Infect*. 2012 May; 42(5):181-7. doi: 10.1016/j.medmal.2012.04.011.

Uehara EU, Shida Bde S, de Brito CA. Role of nitric oxide in immune responses against viruses: beyond microbicidal activity. *Inflamm Res*. 2015 Nov; 64(11):845-52. doi: 10.1007/s00011-015-0857-2.

Woessner M, Smoliga JM, Tarzia B, Stabler T, Van Bruggen M, Allen JD. A stepwise reduction in plasma and salivary nitrite with increasing strengths of mouthwash following a dietary nitrate load. *Nitric Oxide*. 2016 Apr 1; 54:1-7. doi: 10.1016/j.niox.2016.01.002.

Wright G, Jalan R. Management of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2007; 21(1):95-110. doi: 10.1016/j.bpg.2006.07.009.

APÊNDICE A – Termo De Consentimento Livre e Esclarecido
“Detecção dos poliomavírus humano JC e BK em fluidos orais de indivíduos imunossuprimidos”

Este termo tem a finalidade de esclarecer ao participante sobre o projeto de pesquisa “Detecção dos poliomavírus humano BK e JC em fluidos orais de indivíduos imunossuprimidos” a ser desenvolvido pelas alunas de pós graduação Talita de Castro Alves, Joice Guilherme, Marília Andrade Figueiredo e Daniela Assis do Vale sob orientação das Profas. Dra. Marina Helena Cury Gallottini e Karem Lopez Ortega.

Esse estudo visa detectar a possível presença dos poliomavírus humano na saliva e fluido crevicular, comparativamente a urina e sangue, em pessoas normorreativas e também com diversas formas de imunossupressão, tais como insuficiência renal crônica, pessoas HIV positivas, HTLV positivas, hepatopatas (cirrose) e pessoas transplantadas.

Os indivíduos que concordarem em participar da pesquisa responderão a um questionário sobre a sua 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 (gingiva), cárie e eventuais lesões na boca.

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

Esta pesquisa lhe trará o benefício de saber se você tem ou não alguma doença de boca e, se ela existir, você poderá tratá-la no CAPE. Além disso, poderemos detectar a presença do vírus polioima e, neste caso, encaminhá-lo para avaliação especializada. Sendo que indivíduos sem imunossupressão não apresentam risco de desenvolverem doença relacionada com a presença desse vírus.

Os riscos e desconfortos do exame clínico, preenchimento do questionário e coleta de saliva e urina serão mínimos, já que fazem parte dos cuidados de todos os pacientes. Com relação à coleta de sangue, há risco de formação de hematoma no local da coleta. A coleta do fluido gengival crevicular poderá trazer mínimo desconforto no momento em que é realizado.

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 por 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 tubo de sangue será coletado através da punção na região da dobra do cotovelo.
- Urina: a coleta de urina será realizada pelo próprio paciente, em tubo coletor fornecido pelo pesquisador.

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

Existem outros vírus de interesse que podem estar presentes nas amostras coletadas e por isso elas podem ser usadas em outros estudos, desta forma:

() NÃO AUTORIZO a utilização de dados ou do material biológico (saliva, fluido gengival, urina 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 as pesquisadoras Joice Guilherme, Talita de Castro Alves, Marília Andrade Figueiredo e Daniela Assis do Vale estarão disponíveis 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 cepo@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, Joice Guilherme Marília Andrade Figueiredo e Daniela Assis do Vale caso tenha alguma dúvida. Eu concordo voluntariamente em participar do estudo “Detecção dos poliomavírus humano BK e JC em fluidos orais de indivíduos imunossuprimidos”.

Assinatura do participante

Assinatura do pesquisador

São Paulo, _____ de _____ de _____.

APÊNDICE B - Ficha Grupo Estudo

Data: ____/____/____

Nome: _____ Idade: _____

Gênero: Masculino ☐ Feminino ☐

Medicações em uso:

O paciente tem história de algumas das doenças listadas abaixo?

Hipertensão Sim ☐ Não ☐ Não sabe ☐Diabetes Tipo: _____ Sim ☐ Não ☐ Não sabe ☐Doença da tireoide Sim ☐ Não ☐ Não sabe ☐Hepatite Tipo: _____ Sim ☐ Não ☐ Não sabe ☐Anemia Sim ☐ Não ☐ Não sabe ☐Infecção Urinária Recorrente Sim ☐ Não ☐ Não sabe ☐Doença Psiquiátrica/Neurológica Tipo: _____ Sim ☐ Não ☐ Não sabe ☐

MELD _____

HTLV ASSINTO Sim ☐ Não ☐TSP/HAM Sim ☐ Não ☐ATLL Sim ☐ Não ☐

OSAME _____

Outras: _____

Apresentou infecções recorrentes nos últimos anos? Sim ☐ Não ☐

Quais? _____

Tempo De Diagnóstico Da Doença De Base: _____

Realizou algum transplante? Sim ☐ Não ☐ Quando? _____História passada de uso de álcool: Sim ☐ Não ☐ Bebe atualmente: Sim ☐ Não ☐Qual a frequência do uso do álcool? Diariamente ☐ Semanalmente ☐2-4 vezes por semana ☐ Nos finais de semana ☐ Ocasionalmente ☐Você fuma? Ou Já foi fumante? Sim ☐ Não ☐

Há quanto tempo? _____

Tem sensação de boca seca? Sim ☐ Não ☐

Escala Tess _____

Sialometria _____

Aumento de glândulas salivares Sim ☐ Não ☐

Quais? _____

APÊNDICE C – Ficha Grupo Controle

Data: ____/____/____

Nome: _____

Gênero: Masculino ☐ Feminino ☐ Idade: _____

Medicações em uso:

O paciente tem história de algumas das doenças listadas abaixo?

Hipertensão Sim ☐ Não ☐ Não sabe ☐Diabetes Tipo: _____ Sim ☐ Não ☐ Não sabe ☐Doença da tireoide Sim ☐ Não ☐ Não sabe ☐Hepatite Tipo: _____ Sim ☐ Não ☐ Não sabe ☐Anemia Sim ☐ Não ☐ Não sabe ☐Infecção Urinária Recorrente Sim ☐ Não ☐ Não sabe ☐Doença Psiquiátrica/Neurológica Tipo: _____ Sim ☐ Não ☐ Não sabe ☐

Outras: _____

Apresentou infecções recorrentes nos últimos anos? Sim ☐ Não ☐

Quais? _____

História passada de uso de álcool: Sim ☐ Não ☐ Bebe atualmente: Sim ☐ Não ☐Qual a frequência do uso do álcool? Diariamente ☐ Semanalmente ☐2-4 vezes por semana ☐ Nos finais de semana ☐ Ocasionalmente ☐Você fuma? Ou Já foi fumante? Sim ☐ Não ☐

Há quanto tempo? _____

Tem sensação de boca seca? Sim ☐ Não ☐

Sialometria _____

Aumento de glândulas salivares Sim ☐ Não ☐

Quais? _____

APÊDICE D – Resultados das quantificações de BKV e JCV nos diversos fluídos analisados, por paciente

Pacientes	Saliva JCV	Soro JCV	Lavado JCV	Urina JCV	Saliva BKV	Soro BKV	Lavado BKV	Urina BK
GE 1	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	2404 cópias/mL
GE 2	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	7094 cópias/mL	NEG
GE 3	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	2560 cópias/mL	1695 cópias/mL
GE 4	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	14662 cópias/mL	NEG
GE 5	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
GE 6	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
GE 7	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	73035 cópias/mL
GE 8	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
GE 9	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	6084 cópias/mL
GE 10	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
GE 11	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	2.306 cópias/mL	NEG	3892 cópias/mL
GE 12	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	7878 cópias/mL	NEG	36084 cópias/mL
GE 13	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	3134 cópias/mL	NEG
GE 14	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	11975 cópias/mL	NEG
GE 15	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	1768 cópias/mL
GE 16	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	11168 cópias/mL	NEG
GE 17	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	2.322 cópias/mL	4444 cópias/mL	19251 cópias/mL
GE 18	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	1660 cópias/mL	Indetectável
GE 19	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
GE 20	NEG	NEG	NEG	POS	3.785 cópias/mL	NEG	NEG	NEG
GE 21	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
GC 1	NEG	NEG	NEG	POS NQ	1239 cópias/mL	NEG	1.116 cópias/mL	3.706 cópias/mL
GC 2	NEG	NEG	NEG	Não coletado	3518 cópias/mL	NEG	POS NQ	Não coletado
GC 3	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	1366 cópias/mL	NEG
GC 4	NEG	NEG	NEG	NEG	3732 cópias/mL	NEG	2.614 cópias/mL	NEG
GC 5	NEG	NEG	NEG	NEG	7398 cópias/mL	NEG	NEG	9713 cópias/mL
GC 6	NEG	NEG	NEG	Não coletado	1582 cópias/mL	NEG	NEG	Não coletado
GC 7	NEG	NEG	NEG	4471 cópias/mL	NEG	NEG	NEG	NEG
GC 8	NEG	NEG	NEG	NEG	POS NQ	NEG	POS NQ	POS NQ
GC 9	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	1936 cópias/mL	NEG	NEG
GC 10	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
GC 11	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	3579 cópias/mL	NEG
GC 12	NEG	NEG	NEG	69303710 cópias/mL	1131 cópias/mL	NEG	NEG	NEG

GC 13	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	3784 cópias/mL	24579 cópias/mL
GC 14	NEG	NEG	NEG	NEG	1743 cópias/mL	7.094 cópias/mL	Indetectável	1375 cópias/mL
GC 15	NEG	NEG	NEG	NEG	6662 cópias/mL	NEG	NEG	NEG
GC 16	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	1.950 cópias/MI	4144 cópias/mL	NEG
GC 17	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
GC 18	NEG	NEG	NEG	NEG	3785 cópias/mL	NEG	NEG	NEG
GC 19	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
GC 20	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG

GE – grupo estudo; GC – grupo controle; NEG – negativo; POS - positivo

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 BK e JC em fluidos orais de indivíduos imunossuprimidos

Pesquisador: Marina Helena Cury Gallottini

Área Temática:

Versão: 7

CAAE: 15042613.6.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.293.889

Apresentação do Projeto:

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). Além de serem facilmente coletados e armazenados, são adequados para a detecção precoce de doenças, já que possuem marcadores biológicos específicos. Até o presente momento, poucos trabalhos demonstraram a detecção dos poliomavírus humano BK (BKV) e JC (JCV) em saliva e nenhum

trabalho procurou sua presença no FGC. Esses poliomavírus infectam assintomaticamente em torno de 80% da população geral, mantendo-se latente no organismo. No caso de imunossupressão mediada por células, nota-se o aumento da replicação e indução de reação inflamatória. Uma das doenças causadas pela replicação do BKV e a nefropatia associada ao poliomavírus (NAP), caracterizada pela disfunção e perda do próprio rim ou do rim transplantado. Métodos não invasivos para o screening podem facilitar a detecção de

novos casos e a monitoração de casos previamente conhecidos. O objetivo deste estudo é verificar a possibilidade de detecção e quantificação do BKV e JCV na saliva e FGC de indivíduos com diferentes formas de imunossupressão, tais como os infectados pelo HIV, pessoas com insuficiência renal crônica, em terapia dialítica e em indivíduos controle, imunocompetentes. Além disso, pretendemos comparar os achados nos fluidos orais com os encontrados no sangue e na urina especialmente em termos quantitativos

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Detectar e quantificar os poliomavírus humanos (BK e JC) na saliva e fluido gengival crevicular de pessoas cuja imunodeficiência foi causada por motivos diversos, tais como a insuficiência renal crônica e a infecção pelo HIV.

Objetivo Secundário:

Como objetivo secundário, pretendemos comparar os achados nestes fluidos com os 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, nas diferentes populações estudadas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS: 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 a dor local.

BENEFÍCIOS: Os sujeitos da pesquisa serão avaliados clinicamente quanto à necessidade de tratamento odontológico e caso precisem, receberão atendimento. Além disso, o poliomavírus humano nos subtipos BK e JC estão associados a doenças sistêmicas e ao 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 quando necessária.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Na versão 6 do projeto, aprovada no parecer 919.077, em 17/12/2015, havia sido mencionado o acréscimo de outros grupos de pacientes. O CEP aprovou, porém, a pedido dos pesquisadores, listamos neste parecer os citados grupos: 20 transplantados renais, 20 hepatopatias crônicas, 20 transplantados de fígado e 20 pacientes HTLV+.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos de apresentação obrigatória foram entregues ao CEP.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil). Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

Considerações Finais a critério do CEP:

O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento Arquivo Postagem Autor Situação

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_599504_E4.pdf	28/09/2015 13:52:39		Aceito
Folha de Rosto	rosto conep.pdf	08/12/2014 14:50:39		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE polioma .docx.doc	08/12/2014 13:32:14		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE .docx.doc	04/12/2014 16:40:40		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE atualizado .docx.doc	07/10/2014 13:34:53		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto plataforma brasil.docx	29/09/2014 16:58:23		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	10/12/2013 11:06:48		Aceito
Outros	Carta de aceite IMT.pdf	27/03/2013 19:37:02		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

SAO PAULO, 23 de Outubro de 2015

Assinado por:

Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)