JEFFERSON DA ROCHA TENÓRIO

Avaliação dos níveis séricos e salivares de RANKL, OPG, IL-1β, IL-6 e TNF-α e sua relação com o índice da cortical mandibular em pacientes com cirrose hepática

São Paulo

2019

JEFFERSON DA ROCHA TENÓRIO

Avaliação dos níveis séricos e salivares de RANKL, OPG, IL-1β, IL-6 e TNF-α e sua relação com o índice da cortical mandibular em pacientes com cirrose hepática

Versão Original

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

Área de concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais

Orientador: Profa. Dra. Karem López Ortega

São Paulo

2019

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.

Catalogação da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Tenório, Jefferson da Rocha
Avaliação dos níveis séricos e salivares de RANKL, OPG, IL-1β, IL-6 e TNF-α e sua relação com o índice da cortical mandibular em pacientes com cirrose hepática/ Jefferson da Rocha Tenório; orientador Karem López Ortega. -- São Paulo, 2019.
81 p. : fig., tab., 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Cirrose hepática. 2. Osteoporose. 3. Osteoprotegerina. 4. Radiografia panorâmica. I. Ortega, Karem López. II. Título.

Tenório JR. Avaliação dos níveis séricos e salivares de RANKL, OPG, IL-1β, IL-6 e TNF-α e sua relação com o índice da cortical mandibular em pacientes com cirrose hepática. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 18 /11/2019

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a).Marina Gallottini

Instituição: FO-USP Julgamento: APROVADO

Prof(a). Dr(a). Karin Sá Fernandes

Instituição: Universidade Cidade de São Paulo UNICID Julgamento: APROVADO

Prof(a). Dr(a). Fernanda de Paula Eduardo

Instituição: Hospital Israelita Albert Einstein Julgamento: APROVADO

Dedico esse trabalho ao meu esposo, amigo, companheiro, maior incentivador, apoio, suporte, repouso, fonte de alegria, de sossego, de amor, de carinho e responsável pelas melhores memórias que tive o privilégio de viver nos últimos anos. João, sem você esta caminhada seria cruel e sem cor. Obrigado por confiar em mim em todos os momentos. Eu te amo!

AGRADECIMENTOS

A Deus por nunca ter me abandonado e por sempre estender sobre mim a sua misericórdia e o seu amor. Obrigado por guiar os meus passos e me dar forças quando pensei em desistir.

À minha Mãe, Maria José da Rocha Tenório, por acreditar em mim muito mais que eu mesmo. Obrigado por me acolher com suas palavras tão ternas todos os dias da minha vida. Você é o meu maior exemplo de resistência e resiliência. Eu te amo e sem você e seu apoio, nada disso seria possível.

Aos meus irmãos, Preto (Matheus) e Dindon (Leidyanne), por serem os melhores irmãos que eu poderia ter. Vocês dizem que eu vos orgulho, mas não têm noção do quanto eu me sinto privilegiado por ter vocês ao meu lado.

Aos meus avós (vovô Jacó, vovó Lígia, vovô Paulo e vovó Rita) e tia Lourdes por orarem por mim todos os dias. Sinto o amor de vocês por mim a cada amanhecer.

À minha “esposa”, Thalita Santana, com quem convivi por cerca de cinco anos durante a pós-graduação. Você é e sempre será aquela amiga que a gente vai se orgulhar de falar para os filhos. Obrigado por dividir comigo dos mais diversos momentos, inclusive daqueles em que a gente só sentava um do lado do outro, sem fazer nada, e aproveitava da presença do outro por horas. Eu te amo. Aproveito o ensejo para agradecer a Dona Osmalinda, sua mãe, que sempre arcou com os custos extras que nosso apartamento necessitava. Custos que eu não poderia pagar e me impossibilitaria de seguir com os meus sonhos.

Ao meu “filho”, Marcos Custódio, com quem convivi durante os três anos do doutorado. Embora eu te chame de filho, acredito que nossa relação foi, na verdade, uma troca de experiências e de conselhos. E, como um bom pai, eu tenho muito orgulho de você.

Aos amigos pós-graduandos que fiz durante o doutorado: Nathália Duarte, Marília Figueiredo, Bruna Rech, Letícia Tonin, Letícia Drumond, Solange Velasco, Maria Fernanda Bartholo, Karin Fernandes, Juliana Mota, Juliana Costa, Marina Tuma, Emília Aguiar, Cibele Pelissari, Stephanie Kenig, Bruno Matuck e os demais que provavelmente eu me esqueci de citar. Vocês fizeram essa caminhada mais alegre e compartilharam comigo de momentos que ficarão para sempre guardados na minha memória. Em especial, agradeço à Natália Andrade, minha amiga piauiense repleta de adjetivos, por ser uma das maiores e melhores aquisições ao longo do doutorado. Você me ouviu, entendeu e orientou. Sua amizade é um presente.

Aos amigos (Rennan Santos, Leorik Pereira, Ana Paula Rufino, Magaiva Rocha, Elaine Alexandre, Tatyane Fernandes, Marcela Gadelha, Melka Sá, Ana Paula Sobral) presentes fisicamente ou que mesmo à distância, me enviaram muita energia positiva para que eu concluísse essa importante etapa da minha vida.

Aos professores da pós-graduação (Marília Trierveiler, Suzana Orsini, Décio Pinto, Luciana Corrêa) por me inspirarem e por me ajudar a construir minha trajetória acadêmica de forma ímpar. Agradeço, em especial, ao professor e amigo, Paulo Braz, por me ensinar que a pós-graduação é muito mais que do que artigos publicados. Você é incrível!

À professora Karem López Ortega, minha orientadora e amiga, por ter me aceitado na pós-graduação. Se eu estou encerrando essa fase da minha vida é porque você confiou em mim desde o primeiro e-mail. Obrigado por abrir as portas do CAPE FO-USP para mim e ter me presenteado com infinitas oportunidades ao longo do doutorado. Você me inspira não só pelo exemplo de docente, pesquisadora e profissional, mas também pela forma que você trata seres humanos como tal. Obrigado por confiar em mim!

À professora Marina Gallottini por sua competência e força de vontade para ensinar, pesquisar, gerir e por tratar a ciência como coisa séria. Obrigado por compartilhar seu conhecimento comigo com muita humildade. Sou orgulhoso em falar que sou seu aluno.

Às funcionárias do CAPE – FOUSP (Sandrinha, Gil, Leninha, Selminha, Gê, Andressa e Fátima) que trabalham muito para que os alunos, dentistas e professores consigam desempenhar suas funções. Vocês foram e são muito importantes para mim. Aproveito para agradecer a cada aluno e dentista do CAPE FO-USP, os quais eu tive a oportunidade de orientar ao longo do doutorado. O que vocês fazem pelos pacientes especiais me faz acreditar num futuro melhor.

Aos pacientes que atendi no CAPE-FOUSP. A história de vida de cada um me deu forças para continuar estudando e tentar ser uma pessoa melhor. Meu coração, agora, enxerga a beleza dos pacientes especiais como nunca antes eu havia enxergado em toda a vida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por financiar a pesquisa no país, mesmo com todas as dificuldades impostas pelo atual e tenebroso governo.

À FO-USP, maravilhosa, lugar que hoje eu tenho o orgulho de chamar de casa.

“Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar."

Josué 1:9

RESUMO

Tenório JR. Avaliação dos níveis séricos e salivares de RANKL, OPG, IL-1β, IL-6 e TNF-α e sua relação com o índice da cortical mandibular em pacientes com cirrose hepática [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019. Versão Original.

Pacientes com cirrose hepática podem desenvolver osteoporose como complicação relacionada ao déficit funcional hepático. O objetivo desse estudo é o de avaliar a presença de proteínas relacionadas ao metabolismo ósseo (RANKL, OPG, IL-1β, IL-6 e TNF-α) na saliva e no sangue de pacientes cirróticos e compará-los com o índice da cortical mandibular (ICM), relacionado à densidade mineral óssea, em radiografias panorâmicas. Trinta e oito pacientes cirróticos foram submetidos à anamnese, exame físico e tiveram amostras de sangue e de saliva não estimulada coletadas. Desses, 22 apresentavam radiografias panorâmicas que foram avaliadas segundo o ICM. As proteínas foram avaliadas através da tecnologia LuminexTM xMAP. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p \leq 0.05$. A maioria dos pacientes era do sexo masculino (68,4%), com idade média de 50,61 anos, média de MELD de 18 pontos no momento da consulta e média de 21,34 meses na fila de espera para o transplante. A análise das radiografias panorâmicas permitiu constatar que a maior parte da amostra apresentava alguma modificação na cortical mandibular sugestiva de alterações osteoporóticas (72,7%). O perfil de expressão das proteínas foi bastante variável no sangue e na saliva. Correlação estatisticamente significativa foi observada entre a expressão salivar de RANKL e OPG em pacientes com ICM alterado. Não foi observada relação estatisticamente significante entre o perfil das proteínas e a etiologia da cirrose, tempo na fila de transplante hepático, idade e sexo dos pacientes. As proteínas RANKL, OPG, IL-1β, IL-6 e TNF-α se comportam de maneira diferente na saliva e no sangue. Valores elevados de RANKL e OPG em saliva estão relacionados com ICM sugestivo de osteoporose em pacientes cirróticos, e propõe-se que esse aumento ocorra devido ao microambiente inflamatório local.

Palavras-chave: Cirrose Hepática. Osteoporose. Ligante RANK. Osteoprotegerina. Inflamação. Radiografia panorâmica.

ABSTRACT

Tenório JR. Evaluation of serum and salivary levels of RANKL, OPG, IL-1β, IL-6 and TNF-α and their association with mandibular cortical index in patients with liver cirrhosis [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019. Versão Original**.**

Patients with liver cirrhosis may develop osteoporosis as a complication related to hepatic functional deficit. The aim of this study is to evaluate the presence of bone metabolism-related proteins (RANKL, OPG, IL-1β, IL-6 and TNF-α) in the saliva and blood of cirrhotic patients and to compare them with mandibular cortical index (MCI), related to bone mineral density, on panoramic radiographs. Thirty-eight cirrhotic patients underwent anamnesis, physical examination and had blood samples and unstimulated saliva collected. Of these, 22 had panoramic radiographs that were evaluated according to the MCI. Proteins were evaluated using LuminexTM xMAP technology. Values of $p \leq 0.05$ were considered statistically significant. Most patients were male (68.4%), with a mean age of 50.61 years, with an average MELD of 18 points at the time of consultation, and an average of 21.34 months in the waiting list of liver transplantation. The analysis of panoramic radiographs showed that most of the sample presented alterations in the mandibular cortex suggestive of osteoporotic alterations (72.7%). The protein expression profile was quite variable in blood and saliva. Statistically significant correlation was observed between salivary expression of RANKL and OPG in patients with altered CMI. There was no statistically significant relationship between protein profile and cirrhosis etiology, time of diagnosis of cirrhosis, age or gender. The RANKL, OPG, IL-1β, IL-6 and TNF-α proteins behave differently in saliva and blood. High RANKL and OPG values in saliva are related to MCI suggestive of osteoporosis in cirrhotic patients, and it is proposed that this increase occurs due to the local inflammatory microenvironment.

Keywords: Cirrhosis. Osteoporosis. RANK Ligand . Osteoprotegerin. Inflammation. Panoramic radiography.

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Caracterização da amostra (n=38): Dados demográficos, MELD, etiologia da cirrose, complicações da cirrose, índice da cortical mandibular, comorbidades e medicações de rotina. 45

Tabela 5.2- Análise descritiva dos valores de RANKL, OPG, RANKL/OPG, IL-1β, IL-6, TNF-α em amostras de sangue e saliva (n=38). Valores em pg/mL. 49

Tabela 5.3- Correlação entre os valores de RANKL, OPG, RANKL/OPG, IL-1β, IL-6, TNF-α encontrados na saliva e em sangue..... 50

Tabela 5.4- Correlação entre a idade e os valores de RANKL, OPG, RANKL/OPG, IL-1β, IL-6, TNF-α encontrados na saliva e sangue. 50

Tabela 5.5- Correlação entre o tempo na fila de transplante hepático os valores de RANKL, OPG, RANKL/OPG, IL-1β, IL-6, TNF-α encontrados na saliva e sangue 51

Tabela 5.6- Média e desvio-padrão dos valores de proteínas avaliadas segundo o índice da cortical mandibular (n=22). 52

Tabela 5.7- Média e desvio-padrão dos valores de proteínas avaliadas segundo causa da hepatopatia crônica (n=38). 53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DMO	densidade óssea mineral
DXA	densitometria de raios X de dupla energia
ICM	Índice da Cortical Mandibular
IL-1β	interleucina 1 beta
IL-6	interleucina 6
MELD	model of end stage liver disease
NFATc1	fator nuclear de células T ativadas citoplasmático
ng/mL	nanogramas por mililitro
OPG	osteoprotegerina
pg/mL	picograma por mililitro
RANK	receptor ativador do fator de transcrição NFκB
RANKL	ligante do receptor ativador do fator de transcrição NFκB
RNA	ácido ribonucleico
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE SÍMBOLOS

ºC	graus Celcius
α	alfa
β	beta
γ	gama
>	maior que
<	menor que

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	25
2	**REVISÃO DE LITERATURA**	27
3	**PROPOSIÇÃO**	37
4	**MATERIAL E MÉTODOS**	39
5	**RESULTADOS**	45
6	**DISCUSSÃO**	55
7	**CONCLUSÕES**	59
	REFERÊNCIAS	61
	APÊNDICES	71
	ANEXOS	79

1 INTRODUÇÃO

A cirrose hepática é uma consequência frequente do curso clínico de diversas doenças hepáticas crônicas e é caracterizada pela intensa fibrose tecidual e formação de nódulos na estrutura do fígado (Pinzani, 2015).

Pacientes cirróticos em fila de transplante enfrentam diversas complicações relacionadas com o déficit funcional hepático, entre elas, a osteodistrofia hepática. A osteodistrofia hepática é a doença óssea associada à doença hepática crônica e inclui desde condições relativamente raras, como a osteomalácia, quanto condições mais comuns, como a osteoporose (Luxon, 2011). A patogênese da osteodistrofia hepática é complexa e inclui fatores genéticos, deficiência nutricional, baixas concentrações de cálcio e de vitamina D, baixo fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 e o consumo excessivo de álcool (Moschen et al., 2005). Sabe-se que essa condição é responsável por fraturas ósseas espontâneas ou sob traumas de baixa intensidade, as quais apresentam significativo impacto na qualidade de vida dos pacientes acometidos (Guañabens; Parés, 2010).

No contexto dos distúrbios do metabolismo ósseo, como a osteoporose, efeitos importantes em osteoblastos e osteoclastos são exercidos por um sistema de proteínas composto por osteoprotegerina (OPG), receptor ativador do fator de transcrição NFκB (RANK), e o ligante do receptor ativador do fator de transcrição NFκB (RANKL) (Tyrovola, 2017). O sistema RANK-RANKL-OPG apresenta diversas funções biológicas tanto no metabolismo ósseo, quanto na homeostase do sistema imune (Walsh; Choi, 2014). O desajuste nesse sistema proteico já foi estudado em diversas condições como no processo de metástase e invasão de neoplasias malignas (Tan et al., 2011), na artrite reumatoide (Remuzgo-Martínez et al., 2016) e na osteoporose (Yasuda, 2013).

Por outro lado, citocinas pró-inflamatórias como a interleucina (IL)-1β, IL-6 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) têm sido alvo de estudo por participar não só dos processos de inflamação, esteatose, fibrose e carcinogênese, mas também do processo de perda óssea (Santos; Romeiro, 2016; Del Campo et al., 2017). Sendo importante ressaltar que pacientes cirróticos enfrentam uma importante

desregulação nas respostas imunológicas, visto que o fígado é um órgão central do sistema retículo-endotelial e por causa do sequestro de leucócitos realizado pelo baço (Bonnel et al., 2011).

Ainda que o padrão ouro para o diagnóstico de alterações de densidade mineral óssea (DMO) seja a densitometria de raios X de dupla energia (DXA), alternativas podem ser utilizadas, como indicadores prévios, para auxiliar no diagnóstico de osteoporose. Diversos índices radiomorfométricos em radiografias panorâmicas comprovaram tanto ser ferramentas muito úteis na execução do rastreio de baixa DMO (Calciolari et al., 2015), como apresentar correlação com marcadores bioquímicos do *turn over* ósseo em pacientes com osteoporose (Taguchi et al., 2003; Vlasiadis et al., 2008; Nagi et al., 2014; Balto et al, 2018).

Tendo em vista o que foi exposto, o objetivo desse estudo é o de avaliar a presença das proteínas RANKL, OPG, IL-1β, IL-6 e TNF-α no fluido salivar e no sangue de pacientes cirróticos e compará-los com evidências alterações osteoporóticas observadas em radiografias panorâmicas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CIRROSE HEPÁTICA E OSTEOPOROSE

A cirrose hepática é a fase final de todas as doenças hepáticas crônicas e progressivas e caracteriza-se por dois eventos principais: hipertensão portal e insuficiência hepática. Esses eventos podem levar a muitas complicações que resultam, potencialmente, em múltipla falha de órgãos, uma vez que, além do fígado, a cirrose prejudica o funcionamento cardíaco, pulmonar, renal, imunológico e endócrino (Nusrat et al., 2014; Møller; Bendtsen, 2015).

A história natural da cirrose é tradicionalmente dividida em duas fases: uma fase inicial de longa duração denominada cirrose compensada, caracterizada pela ausência de sintomas, seguida de um estágio avançado (ou seja, cirrose descompensada) que é caracterizado pelo desenvolvimento de complicações clinicamente evidentes da hipertensão portal (ascite, sangramento de varizes, encefalopatia hepática) ou da insuficiência hepática (icterícia) (D'Amico et al., 2006; Garcia-Tsao et al, 2010).

O termo osteodistrofia hepática engloba uma variedade de doenças ósseas associadas ao comprometimento crônico do fígado, e compreende a osteomalácia e a osteopenia/osteoporose. A osteomalácia é caracterizada por falha na mineralização normal do osso e cartilagem epifisária, resultando em deformidade esquelética. Isso raramente é visto na cirrose hepática (Luxon, 2011).

A osteoporose é uma condição esquelética sistêmica caracterizada pela diminuição da massa óssea e distorção microarquitetural do tecido esquelético, resultando em aumento da fragilidade óssea e risco de fratura e que tem impacto negativo na qualidade de vida devido à dor e deformidades. A Organização Mundial da Saúde classifica essa doença óssea com base na DMO, que é acessada através da DXA, geralmente medida na coluna lombar e no colo do fêmur. A DXA estabelece um T escore, no qual um desvio padrão da DMO <2,5 abaixo da média da massa óssea do adulto jovem (escore T ≤ − 2,5) é definido como osteoporose. Um escore T entre -1 e −2,5 é definido como osteopenia. A osteoporose grave ou estabelecida é

diagnosticada quando o escore T é ≤ −2,5 ou na presença de uma fratura por fragilidade (Nakchbandi, 2014). A DMO está inversamente relacionada ao risco de fratura. Fraturas comuns associadas à osteoporose incluem fraturas por compressão vertebral, fraturas proximais do fêmur e fraturas do rádio distal. A baixa DMO é observada em vários distúrbios hepáticos, como doença hepática colestática, hepatite viral, hemocromatose, cirrose alcoólica, esteato-hepatite não alcoólica e em pacientes transplantados hepáticos (Yadav; Carey, 2013).

É importante destacar que a maior sobrevida de pacientes cirróticos aumentou o risco de algumas manifestações extra-hepáticas, como a osteoporose. Independentemente da etiologia da doença hepática, a presença de cirrose implica em um risco de fratura duas vezes maior do que em pessoas não-cirróticas. Além disso, essa é a única complicação da cirrose que persiste por anos após o transplante de fígado (Santos; Romeiro, 2016).

Apesar da heterogeneidade entre os estudos, dados apontam para o aumento da prevalência da osteoporose em indivíduos com cirrose. Karoli et al. (2016) observaram que 70,8% dos pacientes cirróticos em seu estudo apresentavam um T score < -1. Por sua vez, Alcalde et al. (2012) mostrou que a osteoporose dentro do quadro clínico da cirrose hepática de pacientes em fila de transplante é altamente prevalente, particularmente na coluna vertebral, com uma prevalência global de 70%. Lupoli et al. (2016) realizaram uma revisão sistemática com meta-análise que constatou que a prevalência de osteoporose em pacientes cirróticos é de 34,7% quando comparado com indivíduos saudáveis.

No que ser refere à presença de fraturas, Liang et al. (2018) realizaram uma revisão sistemática com meta-análise que revelou que a cirrose está associada a um risco de 1,88 vezes maior de fratura. O risco relativo de fratura de quadril, fratura de coluna/tronco ou fratura de membro foi, respectivamente, 2,11, 2,00 e 1,82 vezes maior em pacientes cirróticos, Além disso, conforme Montomoli et al. (2018) cerca de 18,5% dos pacientes com cirrose hepática que sofrem fratura de quadril costumam ir a óbito no primeiro ano após a fratura. Esses dados sugerem a necessidade do acurado rastreio da redução da DMO em pacientes com cirrose hepática a fim de planejar um adequado manejo dessa condição.

2.2 PATOGÊNESE DA OSTEOPOROSE NA CIRROSE HEPÁTICA

A patogênese da osteoporose na cirrose é complexa e está relacionada tanto à reabsorção óssea aumentada quanto à redução da formação óssea. Este remodelamento ósseo instável é causado por uma série de mecanismos, alguns dos quais permanecem desconhecidos. Em alguns casos, a fisiopatologia da perda óssea está relacionada intimamente com a etiologia da cirrose, tal como é visto na cirrose biliar primária. Entretanto, um número relativamente significativo de fatores é comum independente da etiologia da doença hepática crônica, como é o caso da deficiência de vitamina D (Handzlik-Orlik et al., 2016).

A vitamina D juntamente com o paratormônio e a calcitonina regulam os níveis séricos de cálcio e a remodelação óssea (Karoli et al., 2016). Por esse motivo, o fígado desempenha um importante papel na manutenção da homeostasia do metabolismo ósseo, pois é nesse órgão que ocorre uma das fases de hidroxilação da vitamina D (Udomsinprasert, 2019).

A vitamina D2 e vitamina D3 são as das formas bioequivalentes da vitamina D e ambas são obtidas através de fontes dietéticas, como peixes gordos, ovos e alimentos fortificados. No entanto, elas se originam de fontes distintas. A vitamina D2, conhecida como ergocalciferol, é sintetizada em algumas plantas, mas predominantemente em fungos envolvendo a ação ultravioleta B no ergosterol. Nos seres humanos, a fonte natural principal da vitamina D3 é produzida na pele pela radiação de UVB da luz solar onde o dehidrocholesterol 7, que é um metabolito do colesterol, é convertido na pré-vitamina D3 na epiderme mais baixa. A pré-vitamina D3 é então transformada em vitamina D3 (colecalciferol) através de isomerização termo-dependente (Udomsinprasert, 2019).

A vitamina D3 não é biologicamente ativa, sendo transportada da pele até ao fígado, pela proteína de transporte da vitamina D, na corrente sanguínea. No fígado a vitamina D3 é hidroxilada no carbono 25, pela ação da enzima vitamina D-25 hidroxilase, originando a 25-hidroxivitamina D3 (25-OH-D3), também conhecida por calcidiol, cujo nível no sangue é um indicador dos níveis de vitamina D. O calcidiol é a forma de vitamina D mais abundante na circulação sanguínea, mas não é biologicamente ativo. Para apresentar atividade biológica, o calcidiol tem que ser

hidroxilado no carbono-1, pela enzima 25-hidroxivitamina D-1α-hidroxilase presente nos rins, originando a 1,25-dihidroxivitamina D3 (1,25(OH)2D3), também conhecida como calcitriol (Karoli et al., 2016). Uma vez ativa, a vitamina D proporciona a absorção intestinal do cálcio, excreção renal de fosfato, além de modular diversos eventos relacionados à homeostase do sistema imune (Udomsinprasert, 2019).

A deficiência de vitamina D e o consequente prejuízo à homeostase óssea em indivíduos cirróticos têm sido relatados por alguns estudos recentes (Kizilgul et al., 2016, Kumar et al. 2017). Esses estudos estão de acordo que uma parcela significativa dos pacientes cirróticos apresentam concentrações séricas de vitamina D consideradas como deficientes (20-30ng/mL) ou insuficientes (<20ng/mL). Acredita-se que esse fenômeno ocorre principalmente por causa do prejuízo na hidroxilação da vitamina D em nível hepatocelular, além de outros motivos, incluindo exposição inadequada ao sol, ingestão dietética insuficiente e prejuízo cutâneo na síntese de vitamina D por causa da icterícia (Tsiaras; Weinstock, 2011).

A liberação, ou aposição de cálcio no tecido ósseo é realizada, em nível celular, através dos osteoclastos e dos osteoblastos (Nakchbandi, 2014). O osteoclasto é uma grande célula multinucleada derivada dos progenitores de linhagem mieloide monocítico-macrofágico, e é a única célula capaz de reabsorver o osso. Os osteoclastos são essenciais para a remodelação óssea, um processo fundamental que controla o crescimento ósseo, a manutenção esquelética e reparo da fratura, além de desempenhar um papel central na patogênese no dano osteoarticular. Os osteoblastos, em contraste, secretam e mineralizam a matriz óssea, e são derivados de um precursor mesenquimal pluripotente primitivo que dá origem a outras células estromais locais, tais como adipócitos, condrócitos e fibroblastos de medula (Martin; Sims, 2015).

A atuação dessas células é orquestrada mediante diversas citocinas, particularmente o grupo de citocinas da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF), a citar: receptor ativador do fator de transcrição nuclear κB (RANK), ligante do receptor ativador do fator de transcrição nuclear κB (RANKL) e a osteoprotegerina (OPG) (Moschen et al., 2005). O sistema RANK–RANKL–OPG foi originalmente descoberto no final da década de 1990, o que o identificou como importante para a imunidade, principalmente por meio de ações em células dendríticas (Anderson et al., 1997), e como importante para a homeostase do tecido ósseo por causa de sua ação nos osteoclastos (Walsh; Choi, 2014).

O processo de proliferação e sobrevivência dos osteoclastos ocorre sob ação do fator estimulante de colônias de macrófagos, produzidos pelos osteoblastos. Por outro lado, o processo de diferenciação dos osteoclastos tem início após a ligação de RANKL ao RANK. Os osteoblastos são uma importante fonte de RANKL, mas a citocina também é expressa por osteócitos, fibroblastos e células do sistema imunológico (incluindo células T estimuladas por antígenos e células dendríticas maduras. A interação RANK-RANKL conduz à ativação do fator mestre da transcrição para a osteoclastogênese: o fator nuclear de células T ativadas citoplasmático 1 (NFATc1). NFATc1 coopera com outros fatores de transcrição para induzir genes relacionados à osteoclastogênese que produzirão, entres outras substâncias, a fosfatase ácida resistente ao tartarato, o receptor de calcitonina e a catepsina K, que são essenciais no processo de reabsorção óssea (Pietschmann et al., 2016).

A descoberta do osteoprotegerina (OPG), um membro solúvel da superfamília do receptor de TNF expressada pelo gene TNFRSF11B, revelou-a como um inibidor poderoso da formação e ativação dos osteoclastos. A OPG tem um papel fisiológico essencial, pois inibe os osteoclastos por via parácrina, uma vez que, após ser produzida pelos osteoblastos, a OPG é capaz de se ligar ao RANKL, impedindo assim sua ligação ao RANK e, consequentemente, inibindo o processo de reabsorção óssea promovido pelos osteoclastos (Martin; Sims, 2015).

É importante ressaltar que na cirrose hepática, particularmente em sua fase descompensada, se estabelece um estado de inflamação sistêmica associado ao prejuízo às respostas imunes, denominada de síndrome da disfunção imune associada à cirrose. Essa síndrome compreende o quadro de estimulação imune persistente causada pela translocação bacteriana e de suas endotoxinas, associada com a exaustão imune por causa desse constante estímulo, levando o paciente a um quadro de imunodeficiência nos estágios mais tardios. Diversas citocinas são constantemente liberadas no contexto dessa inflamação sistêmica, entre elas, proteínas com características pró-inflamatórias como a IL-1β, IL-6 e TNF-α que, como descrito anteriormente, apresentam função pró-osteoclastogênica (Dirchwolf et a., 2016).

Em acréscimo, novas evidências das interações entre o sistema imunológico e o osso se acumularam no estudo das doenças que envolvem o tecido ósseo, incluindo a osteoporose, periodontite e artrite reumatoide. Um desequilíbrio acentuado entre a reabsorção óssea e a formação é central para o início da perda óssea patológica. Desse modo, a osteoimunologia revelou que o sistema imunológico, incluindo células T, células B e citocinas inflamatórias, são reguladores chave da ação de osteoclastos e osteoblastos. Nesse contexto, tem-se aumentado o interesse no estudo de citocinas pró-inflamatórias e de seu papel no metabolismo ósseo (Liu et al., 2017).

A interleucina 1 (IL-1) existe na forma de IL-1α e IL-1β, que, apesar de diferenças na estrutura química, possuem atividade biológica similar. A IL-1β induz a produção de prostaglandinas no tecido ósseo, aumenta a produção de RANKL e inibe a atividade da fosfatase alcalina. Isso leva a um aumento no número de precursores de osteoclastos e à inibição do processo de apoptose de osteoclastos (Rahnama et al., 2013). A IL-6, outra citocina de propriedade pró-inflamatórias, é secretada por uma variedade de células (macrófagos, células T, osteoblastos e células estromais) e é definida como uma proteína ligada ao processo de reabsorção óssea, estimulando a atividade de osteoclastos (Zhu et al., 2018). O TNF-α, uma citocina fundamental e multifuncional produzida principalmente por macrófagos, demonstrou afetar profundamente a diferenciação e a atividade de osteoblastos e osteoclastos durante condições inflamatórias crônicas, como artrite reumatoide e menopausa, promovendo a osteoclastogênese (Zhu et al., 2018).

Além disso, alguns autores têm reportado que pacientes com cirrose hepática podem apresentar um prejuízo na função osteoblástica, que está relacionada à diminuição de fatores tróficos, como o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1, ou a ação prejudicial de substâncias retidas na colestase, como a bilirrubina e os ácidos biliares. Assim, foi relatado que os níveis séricos de fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 estão diminuídos em pacientes com cirrose e, por outro lado, dados experimentais indicam que a administração desse fator aumenta a massa óssea e a densidade mineral óssea em ratos cirrótico (Guañabens, Parés, et al., 2012).

2.3 DENSIDADE ÓSSEA E ÍNDICES RADIOMORFOMÉTRICOS

A definição de osteoporose é baseada em uma DMO usualmente mensurada por meio de um exame de densitometria de raios X de dupla energia (DXA) em quadril ou coluna. Uma medida de DMO 2,5 desvios padrão abaixo do de adultos jovens saudáveis define a presença de osteoporose, enquanto valores entre -1 e -2,5 configuram o status de osteopenia (Kanis et al., 2008; Nakchbandi, 2014).

Embora a DXA seja o padrão ouro para diagnosticar osteoporose, alguns autores acreditam que, devido ao custo financeiro, o acesso a este exame é limitado em um número significativo de países, particularmente países em desenvolvimento (Clò et al., 2015). Dessa forma, não seria ideal a utilização do DXA como ferramenta de rastreio populacional em pessoas que tenham maior propensão a apresentar osteoporose. Exames de imagem alternativos que possam identificar características sugestivas de alterações de densidade mineral óssea são bem vindos e começaram a ser propostos, como a ultrassonografia (Frost et al., 2001).

O uso corriqueiro da radiografia panorâmica na prática clínica odontológica, sua ampla disponibilidade e seu baixo custo (Munhoz et al., 2018) fizeram deste exame um candidato, como método auxiliar, na detecção da osteoporose. Alguns pesquisadores começaram a verificar que a espessura, a morfologia e a porosidade das corticais em radiografias panorâmicas mostravam-se características potencialmente úteis para avaliar o risco individual de osteoporose sistêmica (Horner et al, 1996).

Assim, obter evidências de alterações osteoporóticas tornou-se possível através da avaliação de índices radiomorfométricos que podem ser analisados através de radiografias panorâmicas (Klemetti et al., 1994; Ishii et al., 2007). Os mais utilizados são o índice mentoniano, o índice mandibular panorâmico e o índice de Klemetti (Calciolari et al., 2015).

Uma recente revisão sistemática cujo objetivo era avaliar a acurácia (em relação ao DXA) dos diferentes índices morfométricos panorâmicos para o diagnóstico de osteopenia/osteoporose a partir de uma meta-análise de sua sensibilidade e especificidade, mostrou que os três índices são ferramentas úteis que podem ser potencialmente utilizadas por dentistas no rastreio de baixa DMO. As

limitações dessas análises estão normalmente relacionadas à experiência e a concordância entre diferentes examinadores, as diferenças na qualidade da imagem e as diferentes amplificações utilizadas (Calciolari et al., 2015).

Nessa mesma revisão sistemática, o índice de Klemetti apresentou associação com, pelo menos, osteopenia em aproximadamente 80% dos casos o que faz dele um indicador útil na identificação da redução da DMO (Calciolari et al., 2015).

Esses índices também confirmaram seu potencial como ferramentas com valor preditivo no diagnóstico osteopenia/osteoporose em diferentes grupos de pacientes de risco, como em mulheres pós-menopausa (Navabi et al., 2018), pacientes em uso contínuo de bisfosfonatos (Barngkgei et al., 2018; Kubo et al., 2018), em pacientes com talassemia (Bayrak et al., 2019) e na acondroplasia (Arita et al., 2013).

O índice de Klemetti (índice da cortical mandibular) foi descrito pelo autor homônimo e colaboradores (1994) e classifica qualitativamente o grau de reabsorção do córtex mandibular distalmente ao forame mentoniano nas seguintes categorias: C1, quando a margem endosteal é uniforme e acentuada; C2, quando a margem endosteal apresenta reabsorção lacunar ou resíduos corticais em um ou ambos os lados; e C3, quando a camada cortical é claramente porosa, com densos resíduos corticais endosteais.

Esses índices radiomorfométricos também tem sido associados às concentrações plasmáticas e urinárias de marcadores bioquímicos relacionados ao metabolismo ósseo, como a fosfatase alcalina e o N-telopeptídeos de ligação cruzada com colágeno tipo 1, respectivamente (Taguchi et al., 2003; Deguchi et al., 2008; Vlasiadis et al., 2008).

2.4 USO DA SALIVA COMO BIOMARCADOR PARA OSTEOPOROSE

A saliva é uma solução hipotônica derivada dos ácinos glandulares salivares, fluido crevicular gengival e exsudados da mucosa oral. Aproximadamente 90% do conteúdo salivar é secretado pelas glândulas salivares. A saliva tem uma

composição complexa que inclui ureia, amônia, ácido úrico, glicose, colesterol, ácidos graxos, triglicérides, lipídios neutros, glicolipídeos, aminoácidos, hormônios esteróides, mucina, amilase, lectina, glicoproteína, lisozima, peroxidase e lactoferrina. Ele também contém altas concentrações de Na^{+}, Cl^{-}, Ca^{2+}, K^{+}, HCO^{3-}, H_2PO^{4-}, F^{-} e Mg^{2}+. Além disso, a saliva contém microorganismos que estão relacionados com doenças orais e sistêmicas (Zhang et al., 2016).

Devido ao rápido progresso dos estudos salivares, os pesquisadores propuseram o conceito de salivômica, que englobaria genômica, transcriptômica, proteômica, metabolômica e análise de microRNA (Zhang et al., 2016). Desde então, a saliva tem sido empregada no estudo de diversas doenças sistêmicas, como é o caso do lúpus eritematoso sistêmico (Stanescu et al., 2018), da síndrome de Sjögren (Katsiougiannis; Wong, 2016), das doenças cardiovasculares (Cozma et al., 2017), diabetes (Zygula et al., 2018), do câncer de boca (Sahibzada et al., 2017) e das infecções virais (Castro et al., 2018), entre outras.

A coleta de saliva é um método que não requer pessoas especializadas, possui baixo-custo e é uma técnica não invasiva, uma vez que dispensa o uso de agulhas, provocando menor desconforto e ansiedade aos pacientes. Além disso, alguns estudos têm provado que as concentrações plasmáticas de alguns compostos estão correlacionadas com a excreção salivar dos mesmos. Bezinelli et al (2017), por exemplo, encontraram na saliva um substrato que pode ser utilizado como uma ferramenta para monitorar as concentrações de bussulfano no transplante de células tronco hematopoiéticas, evitando inúmeras punções para coleta de sangue periférico, reduzindo a dor dos pacientes, a necessidade de pessoal especializado para a coleta e custo da operação.

Identificar biomarcadores que indiquem processos locais de perda óssea, tal qual acontece na periodontite já tem sido alvo de alguns estudos. Miricescu et al (2014) observou que biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo (8-hidroxidesoxiguanosina 8, malondialdeído, ácido úrico, e glutationa peroxidase) e à reabsorção óssea (telopeptídeo C-terminal de colágeno tipo 1, metaloproteinases da matriz e osteocalcina) estão presentes na saliva de pacientes com periodontite. Em adição, Fine et al (2014) provou que a presença de proteína inflamatória macrofágica 1 alfa na saliva é um preditor de perda óssea em indivíduos com periodontite agressiva.

No que se refere aos níveis salivares de RANKL e OPG e sua relação com processos de perda óssea, diversos trabalhos têm mostrado que a existência desses marcadores em saliva está vinculada com a presença e com o maior grau de severidade de periodontite. E a mensuração dessas proteínas em saliva é útil como uma ferramenta adjuvante no diagnóstico dessa condição (Tabari et al., 2013; Behfarnia et al., 2016; Ochanji et al., 2017).

Além disso, alguns pesquisadores têm provado que a existência de determinados biomarcadores em saliva pode ser correlacionada com a reduzida DMO. McGehee & Johnson (2004) constataram que a saliva seria um bom fluido para analisar a presença de biomarcadores de remodelação óssea (deoxipiridineo e osteocalcina) e que a presença desses biomarcadores estava correlacionada com alterações na densidade mineral óssea analisada através de ultrassom quantitativo de calcâneo. Já Terracciano et al (2013) constatou que a presença de α-defensina humana derivada de neutrófilo em saliva está intimamente relacionada com maior reabsorção óssea em mulheres com osteoporose pós-menopausa vista através da DXA. Para Pereira et al (2018), aferir as concentrações salivares de cálcio pode ser uma importante ferramenta de rastreio para osteoporose e pode eventualmente ser usada no diagnóstico de alterações minerais ósseas.

3 PROPOSIÇÃO

A avaliar a presença de proteínas relacionadas ao metabolismo ósseo (RANKL, OPG, IL-1β, IL-6 e TNF-α) na saliva e no sangue de pacientes cirróticos e compará-los com índices radiomorfométricos, relacionados à densidade mineral óssea, em radiografias panorâmicas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) via Plataforma Brasil e obteve aprovação sob número de parecer: 3.065.652 (Anexo A). Todos os participantes da pesquisa foram esclarecidos sobre os objetivos e procedimentos e solicitados a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A), obedecendo às diretrizes da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

4.2 DESENHO DO ESTUDO

Foi realizado um estudo observacional de corte transversal em pacientes cirróticos em fila de transplante hepático.

4.3 CASUÍSTICA

Foi utilizada uma amostra de conveniência constituída 38 por indivíduos adultos, de ambos os sexos, que estavam em fila de transplante hepático e que eram atendidos no ambulatório do Centro de Atendimento a Pacientes Especiais (CAPE) da FOUSP.

4.3.1 Critérios de inclusão

- Foram incluídos todos os pacientes cirróticos em fila de transplante hepático, maiores de 18 anos, atendidos no CAPE - FOUSP e que concordaram em participar da pesquisa assinando o TCLE;

4.3.2 Critérios de exclusão

- Pacientes que cuja quantidade de sangue e saliva coletados foi insuficiente para as análises laboratoriais;

4.4 METODOLOGIA

4.4.1 Exame clínico

Os pacientes foram submetidos à anamnese e exame físico e os dados colhidos foram anotados em uma ficha específica (Apêndice 2).

Durante a anamnese foram coletados os seguintes dados: sexo, idade, etilismo, tabagismo, presença ou ausência de doenças sistêmicas crônicas, medicações em uso. Sobre a cirrose hepática foram colhidas as seguintes informações: etiologia (hepatites virais, álcool ou outros), MELD (*model of end stage liver disease*) e complicações da cirrose (hiperesplenismo, encefalopatia hepática, hepatocarcinoma, circulação colateral, alterações nas séries vermelha e branca, coagulopatia, hemorragia digestiva alta, peritonite bacteriana espontânea e ascite).

No exame físico, os pacientes que necessitavam de algum procedimento odontológico, foram agendados e tratados no CAPE de acordo com suas necessidades odontológicas.

4.4.2 Exame radiográfico

Foram utilizadas radiografias panorâmicas realizadas nos últimos 6 meses, provenientes dos prontuários odontológicos dos pacientes, com o objetivo de mensurar o índice da cortical mandibular (ICM) e classificar o paciente de acordo com o índice proposto por Klemetti (Quadro 4.1).

Quadro 4.1 – Índice da Cortical Mandibular proposto por Klemetti et al. (1994)

ÍNDICE DA CORTICAL MANDIBULAR	
Esse índice avalia a cortical inferior da mandíbula, posterior ao forame mentoniano, em ambos os lados, classificando-a em 3 escores:	
C1	Margem endosteal do córtex se apresenta igualada e afilada em ambos os lados, esquerdo e direito;
C2	Margem endosteal apresenta defeitos semilunares (reabsorção lacunar) ou parece formar resíduos corticais endosteais;
C3	Camadas corticais formam camadas densas de resíduos corticais endosteais e está claramente porosa.

Esta análise foi realizada por dois examinadores previamente calibrados (JRT – aluno de doutorado em patologia oral, maxilofacial e pacientes especiais e LM – mestre e especialista em radiologia oral) (Kappa = 0.7) e quando houve discordância, uma terceira opinião foi tomada (ESA – doutora e especialista em radiologia oral). Os pacientes que apresentaram padrões morfológicos sugestivos de alterações de densidade mineral óssea foram encaminhados para o hospital de referência, onde são tratados, para avaliação médica.

4.4.3 Coleta de sangue e saliva

Sangue e saliva foram colhidos para a verificação da presença das seguintes proteínas: RANKL, OPG, IL-1β, IL-6 e TNF-α.

Foi realizada coleta de saliva total não estimulada (SNE). Os pacientes foram orientados a não ingerir alimentos, bebidas e não realizar higiene oral por 60 minutos antes do exame. Para a coleta da SNE os pacientes cuspiram no interior de um funil posicionado dentro de uma proveta plástica graduada, de forma que fornecessem toda a saliva produzida espontaneamente, pelo tempo de 10 minutos. A coleta foi feita por um único examinador e em ambiente bem ventilado, reservado e iluminado. Todas as amostras de saliva coletadas em que foram observados resíduos sanguíneos foram descartadas e coletadas nova amostra em outro momento oportuno.

Após a coleta, a saliva foi imediatamente distribuída em tubos do tipo Safe-Lock (Protein LoBind microcentrifuge tubes® - Eppendorf®, Hamburgo, Hamburgo, Alemanha) devidamente etiquetados e identificados. A saliva foi armazenada em freezer a -80°C até o momento das análises laboratoriais.

O sangue utilizado nas avaliações foi proveniente das coletas de sangue executadas no CAPE-FOUSP para a execução de exames hematológicos e bioquímicos que são solicitados como procedimento de rotina antes da realização de procedimentos odontológicos invasivos.

O material coletado foi armazenado em tubo com ativador de coágulo e ficou em repouso por 30 minutos sob refrigeração a 4ºC. Posteriormente foi centrifugado por 15 minutos em 3000 rotações por minutos. O soro foi separado com a utilização de pipeta e armazenado em tubos do tipo Safe-Lock (Protein LoBind microcentrifuge tubes® - Eppendorf®, Hamburgo, Hamburgo, Alemanha). Ambos foram etiquetados, identificados e congelados em freezer a -80°C até o momento das análises.

4.4.4 Análise Luminex™

Foi utilizada a tecnologia Luminex™ xMAP (Multiple Analyte Profiling), uma modalidade de imunoensaio que utiliza-se de microesferas coradas com fluoróforos. Anticorpos de captura específicos para cada analito foram imobilizados às microesferas através de ligações covalentes não reversíveis. Os ensaios se fundamentaram na metodologia sanduíche convencional, onde o mix de microesferas foi incubado com padrões e amostras em formato de placa de 96 poços. Após a ligação do analito aos anticorpos de captura, a próxima etapa foi a adição do anticorpo de detecção biotinilado. O resultado final foi amplificado através da incubação com o conjugado estreptavidina-ficoeritrina, que se ligou ao anticorpo biotinilado e emitiu sinal fluorescente. A leitura foi realizada através do equipamento Luminex 200(Software xPonent/Analyst versão 4.2), o qual movimentou as esferas em fila única através de feixes de dois lasers diferentes em um citômetro de fluxo. O primeiro feixe de laser detectou/classificou as microesferas e o segundo quantificou o sinal.

Para o presente estudo foram seguidas as instruções providas pelo fabricante com as seguintes especificações: Kit HBNMAG-51K-05 (OPN, OPG, IL1b, IL6 e TNF-α) e Kit HRNKLMAG-51K-01 (RANKL) - Millipore, St Charles, Missouri – USA.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados nos softwares BioEstat (versão 5.3) e Statistical Package for the Social Science (SPSS® for Windows, versão 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para testar a hipótese de normalidade das variáveis quantitativas, onde foi verificada distribuição não-paramétrica dos dados. Foi realizada análise descritiva dos dados através de frequências, média, desvio-padrão, mediana, valor mínimo e máximo. Na análise bivariada para variáveis quantitativas, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn e o teste de Mann Whitney para comparação entre a distribuição dos

dados entre variáveis independentes e os valores das proteínas mensuradas em saliva e sangue. Para verificar a correlação entre os valores das proteínas em saliva e sangue, além da correlação dessas proteínas com a idade e o tempo na fila de transplante, foi aplicada correlação de Spearman. Foram considerados estatisticamente significativos valores $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

A amostra deste estudo foi constituída por 38 pacientes cirróticos em fila de transplante, sendo a maioria do sexo masculino (n=26/68,4%), com idade média de 50,61 anos (mínimo=20 anos, máximo=71 anos, mediana=52,5), que apresentavam média de MELD de 18 pontos (mínimo=11, máximo=30, mediana=17) no momento da consulta e com média de 21,34 meses na fila de espera para o transplante hepático (mínimo=1, máximo=75, mediana=9).

Foram observadas diversas etiologias para a cirrose, e destacam-se as de origem alcoólica (n=11), viral (n=10) e a cirrose criptogênica (n=06). Os pacientes apresentavam diversas complicações relacionadas à cirrose, entre elas, as mais frequentemente encontradas foram as alterações em série vermelha (n=37), coagulopatia (n=36) e a presença de circulação colateral (n=34). Essas informações estão dispostas com detalhes na tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Caracterização da amostra (n=38): Dados demográficos, MELD, etiologia da cirrose, complicações da cirrose, índice da cortical mandibular, comorbidades e medicações de rotina

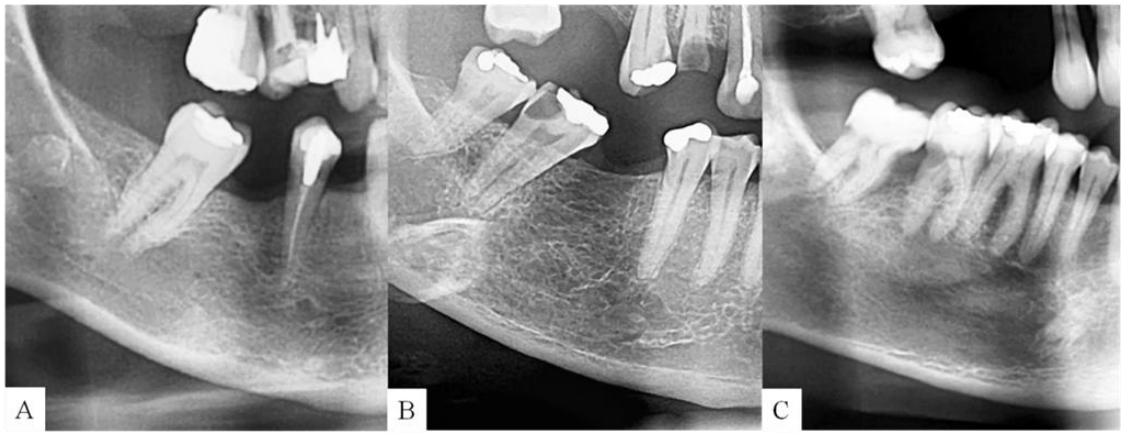
Variáveis	n (%)
Idade (em anos)	50,61 ± 14,38
MELD atual	18,00 ± 4,93
Sexo	
Masculino	26 (68,4)
Feminino	12 (31,6)
Tempo de espera na fila de transplante (meses)	21,34 ± 24,48
Escolaridade (em anos de estudo)	
Até 8 anos	15 (39,5)
Mais de 8 anos	23 (60,5)
Causa da cirrose	
Cirrose alcoólica	11 (28,9)
Cirrose criptogênica	06 (15,8)
Colangite esclerosante	01 (2,6)
Esquistossomose	01 (2,60
Hepatite autoimune	04 (10,5)
Hepatite C	09 (23,7)
Cirrose hepática por esteatose não alcoólica	02 (5,3)
Hepatite B	01 (2,6)
Budd-Chiari	02 (5,3)
Cirrose biliar secundária	01 (2,6)
Complicações da cirrose	
Hepatocarcinoma	
Não	33 (86,8)
Sim	05 (13,2)
Circulação colateral	
Não	04 (10,5)
Sim	34 (89,5)
Ascite	
Não	20 (52,6)
Sim	18 (47,4)
Peritonite bacteriana	
Não	34 (89,5)
Sim	04 (10,5)
Hemorragia digestiva alta	
Não	16 (42,1)
Sim	22 (57,9)
Alterações de série vermelha	
Não	01 (2,6)
Sim	37 (97,4)
Alterações de série branca	
Não	16 (42,1)
Sim	22 (57,9)
Coagulopatia	
Não	02 (5,3)
Sim	36 (94,7)
Índice Radiomorfométrico	
C1	06 (27,3)
C2	13 (59,1)
C3	03 (13,6)
Comorbidades	
Cardiopatias	
Não	37 (97,4)
Sim	01 (2,6)
Nefropatias	
Não	33 (86,8)
Sim	05 (13,2)
Diabetes	
Não	27 (71,1)
Sim	11 (28,9)
Comorbidades pulmonares	
Não	33 (86,8)
Sim	05 (13,2)

Medicações de rotina	
Anti-hipertensivos	27 (71,1)
Hipoglicemiantes orais	04 (10,5)
Insulina	05 (13,2)
Hipoamonêmicos	22 (57,9)
Protetores gástricos	14 (36,8)
Suplementos vitamínicos	06 (15,8)
Hormônios	04 (10,5)
Corticoides	02 (5,3)
Antivirais	02 (5,3)
Anticonvulsivantes	02 (5,3)
Antidepressivos	02 (5,3)

Dos 38 pacientes avaliados, 22 apresentavam radiografias panorâmicas disponíveis para estudo. A análise destas permitiu constatar que a maior parte da amostra apresentava alguma modificação na cortical mandibular sugestiva de alterações osteoporóticas (n=16/72,7%) (Figura 5.1) de acordo com o índice radiomorfométrico avaliado (Tabela 5.1).

Todas as amostras de sangue e de saliva apresentaram imunopositividade para todos os anticorpos avaliados. A Tabela 2 traz uma análise descritiva dos valores absolutos. Os apêndices B e C mostram os valores dessas proteínas em cada participante da pesquisa.

Figura 5.1 – Índice da cortical mandibular de Klemetti encontrados no presente estudo: A) C1 – Cortical mandibular preservada em sua morfologia; B) Defeitos semilunares discretos na porção endosteal; C) Defeitos profundos na cortical mandibular com redução de espessura da mesma



Fonte: CAPE-FOUSP.

Tabela 5.2 – Análise descritiva dos valores de RANKL, OPG, RANKL/OPG, IL-1β, IL-6, TNF-α em amostras de sangue e saliva (n=38). Valores em pg/mL

	Variável	MED	DP	MIN	MAX	Percentis		
						25	50	75
Sangue	**RANKL**	7,45	19,50	0,31	99,85	0,87	1,46	3,77
	OPG	468,10	229,93	191,00	1244,00	275,50	442,00	570,50
	RANKL/ OPG	0,018	0,054	0,000	0,328	0,001	0,003	0,011
	IL-1β	0,64	1,02	0,18	6,52	0,31	0,39	0,59
	IL-6	19,30	30,72	1,83	172,00	4,92	9,95	18,88
	TNF-α	2,43	2,43	0,40	15,94	1,38	2,08	2,71
Saliva	**RANKL**	74,44	181,96	0,27	1122,00	7,20	26,62	75,31
	OPG	342,71	384,84	44,65	1903,00	116,00	216,00	342,25
	RANKL/ OPG	0,337	0,415	0,000	1,432	0,027	0,137	0,579
	IL-1β	45,91	49,90	1,07	240,00	8,38	27,80	68,16
	IL-6	67,69	89,36	6,30	464,00	20,50	32,53	80,10
	TNF-α	5,97	5,37	0,68	23,82	2,58	4,14	7,54

MED: média; DP: desvio padrão; MIN: valor mínimo; MÁX: valor máximo.

Quando se associou a idade com o índice radiomorfométrico empregado, não se observou associação estatisticamente significativa (p=0.655).

Conforme apresentado, as concentrações das proteínas aqui estudadas apresentaram uma ampla variação. Ao se correlacionar os valores encontrados na saliva com aqueles observados no sangue, não foi possível estabelecer fortes correlações, como apresentado na tabela 5.3.

Tabela 5.3 – Correlação entre os valores de RANKL, OPG, RANKL/OPG, IL-1β, IL-6, TNF-α encontrados na saliva e em sangue

Saliva x Sangue		
RANKL	γ	0,226
	p	0,172
OPG	γ	-0,137
	p	0,411
IL-1β	γ	0,101
	p	0,547
IL-6	γ	0,092
	p	0,584
TNF-α	γ	0,097
	p	0,563

γ = Coeficiente de Spearman

Também se tentou correlacionar as concentrações plasmáticas e salivares das referidas proteínas com a idade dos pacientes e com o tempo na fila de transplante hepático. Entretanto, não foi possível constatar correlações fortes conforme disposto nas tabelas 5.4 e 5.5. Também não foi possível encontrar associações estatisticamente significativas entre as concentrações dessas proteínas nos referidos fluidos e as complicações da cirrose hepática.

Tabela 5.4 – Correlação entre a idade e os valores de RANKL, OPG, RANKL/OPG, IL-1β, IL-6, TNF-α encontrados na saliva e sangue

Proteínas em sangue X Idade			Proteínas em saliva x Idade		
RANKL	γ	0,044	**RANKL**	γ	-0,016
	p	0,794		p	0,924
OPG	γ	0,268	**OPG**	γ	0,043
	p	0,104		p	0,799
IL-1β	γ	-0,264	**IL-1β**	γ	-0,391
	p	0,110		p	**0,015**
IL-6	γ	-0,048	**IL-6**	γ	-0,099
	p	0,774		p	0,556
TNF-α	γ	0,184	**TNF-α**	γ	0,206
	p	0,269		p	0,216

γ = Coeficiente de Spearman

Tabela 5.5 – Correlação entre o tempo na fila de transplante hepático os valores de RANKL, OPG, RANKL/OPG, IL-1β, IL-6, TNF-α encontrados na saliva e sangue

Proteínas em sangue X Tempo na fila de transplante hepático			**Proteínas em saliva x Tempo na fila de transplante hepático**		
RANKL	γ	-0,217	**RANKL**	γ	-0,115
	p	0,191		p	0,493
OPG	γ	-0,188	**OPG**	γ	0,098
	p	0,258		p	0,559
IL-1β	γ	-0,084	**IL-1β**	γ	0,225
	p	0,617		p	0,175
IL-6	γ	-0,232	**IL-6**	γ	0,221
	p	0,160		p	0,181
TNF-α	γ	-0,279	**TNF-α**	γ	-0,113
	p	0,089		p	0,499

γ = Coeficiente de Spearman

De acordo com a de Klemetti et al. (1994), radiografias panorâmicas com índice da cortical mandibular nas categorias C2 e C3 são indicativas de pacientes com densidade óssea relativa diminuída. Dessa forma, quando se relacionou as proteínas estudadas com o índice da cortical mandibular, se tornou possível constatar que pacientes que apresentavam maiores valores de RANKL e OPG em saliva, possuíam menor integridade óssea da cortical mandibular (C2 e C3) e esse dado foi estatisticamente significativo. Esse resultado pode ser observado na tabela 5.6.

Tabela 5.6 – Média e desvio-padrão dos valores de proteínas avaliadas segundo o índice da cortical mandibular (n=22)

Variáveis	Índice Radiomorfométrico	Média	Desvio-Padrão	P*
RANKL – sangue	C1	9,51	14,62	0,324
	C2	1,56	1,43	
	C3	1,12	1,18	
OPG – sangue	C1	608,33	369,78	0,428
	C2	411,31	182,53	
	C3	520,00	255,69	
RANKL/OPG – sangue	C1	0,019	0,026	0,398
	C2	0,004	0,004	
	C3	0,003	0,006	
IL-1β – sangue	C1	0,48	0,25	0,981
	C2	0,47	0,26	
	C3	0,42	0,08	
IL-6 – sangue	C1	9,22[a]	5,33	
	C2	11,62[a]	7,57	**0,045**
	C3	54,10[b]	34,86	
TNF- α – sangue	C1	4,66	5,57	
	C2	2,14	0,79	0,465
	C3	3,10	2,04	
RANKL – saliva	C1	27,24[a]	21,59	
	C2	141,30[a]	300,95	**0,036**
	C3	3,37[b]	3,37	
OPG – saliva	C1	149,04[a]	53,94	
	C2	290,44[a]	239,29	**0,038**
	C3	734,33[b]	367,84	
RANKL/OPG – saliva	C1	0,234[a]	0,219	
	C2	0,499[b]	0,521	**0,022**
	C3	0,003[c]	0,003	
IL-1β – saliva	C1	32,88	35,23	
	C2	42,38	41,39	0,737
	C3	46,62	34,49	
IL-6 – saliva	C1	44,34	41,21	
	C2	82,72	90,82	0,440
	C3	25,20	10,56	
TNF- α – saliva	C1	4,28	1,50	
	C2	7,08	6,68	0,713
	C3	12,10	11,26	

P – Teste de Kruskall-Wallis. Realizado Pós-teste de Dunn. Letras diferentes significam valores de p <0,05.

Por causa da ampla variedade de causas que levaram os pacientes à cirrose, no presente estudo, optou-se por agrupar categorias: 1) Cirrose Alcoólica, 2) Hepatites Virais (B, C) e 3) Outras etiologias. Contudo, quando se relacionou a expressão das proteínas estudadas com estas categorias, não foi possível encontrar diferenças estatisticamente significativas como pode ser observado na Tabela 5.7.

Tabela 5.7 – Média e desvio-padrão dos valores de proteínas avaliadas segundo causa da hepatopatia crônica (n=38)

Variáveis	Causa da hepatopatia crônica	Média	Desvio-Padrão	P*
RANKL – sangue	Cirrose alcoólica	14,28	30,40	0,376
	Hepatites virais	3,19	3,15	
	Outras causas	5,53	15,77	
OPG – sangue	Cirrose alcoólica	405,63	133,61	0,834
	Hepatites virais	446,10	178,30	
	Outras causas	521,47	295,30	
RANKL/OPG – sangue	Cirrose alcoólica	0,040	0,097	0,449
	Hepatites virais	0,008	0,009	
	Outras causas	0,009	0,020	
IL-1β – sangue	Cirrose alcoólica	0,548	0,327	0,084
	Hepatites virais	0,389	0,248	
	Outras causas	0,853	1,481	
IL-6 – sangue	Cirrose alcoólica	12,55	16,98	
	Hepatites virais	28,32	51,01	0,421
	Outras causas	18,36	21,33	
TNF- α - sangue	Cirrose alcoólica	1,61	0,61	
	Hepatites virais	3,74	4,35	0,063
	Outras causas	2,19	1,08	
RANKL – saliva	Cirrose alcoólica	34,89	33,76	
	Hepatites virais	40,30	39,48	0,902
	Outras causas	120,12	266,38	
OPG – saliva	Cirrose alcoólica	305,93	272,06	
	Hepatites virais	443,29	592,14	0,995
	Outras causas	307,35	300,69	
RANKL/OPG – saliva	Cirrose alcoólica	0,33	0,44	
	Hepatites virais	0,32	0,43	0,913
	Outras causas	0,42	0,41	
IL-1β – saliva	Cirrose alcoólica	66,39	70,67	
	Hepatites virais	29,47	39,12	0,263
	Outras causas	42,33	36,12	
IL-6 – saliva	Cirrose alcoólica	72,67	130,60	
	Hepatites virais	73,90	100,05	0,795
	Outras causas	60,82	45,64	
TNF- α - saliva	Cirrose alcoólica	5,16	4,19	
	Hepatites virais	3,92	3,25	0,210
	Outras causas	7,69	6,61	

P – Teste de Kruskall-Wallis.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo possibilitou reforçar que o desequilíbrio no metabolismo ósseo é uma complicação presente na cirrose hepática. Aqui se ressalta mais uma vez que a osteodistrofia hepática é multicausal, o que significa que diversos fatores podem influenciar na perda da DMO nos pacientes com cirrose hepática. Além disso, uma importante parcela dos pacientes analisados apresentavam imagens de radiografia panorâmica com imagens sugestivas de redução da DMO e mostraram um perfil de citocinas bastante variável.

A deterioração da cortical mandibular observada através do índice de Klemetti foi observada em vários pacientes nesse estudo. O uso de ferramentas de rastreio para a osteoporose parte do princípio da utilização de técnicas menos onerosas e menos invasivas que permitam o diagnóstico presuntivo de alterações na DMO. De modo semelhante ao presente trabalho, Wakolbinger et al. (2019) investigou a microarquitetura óssea de pacientes cirróticos através de uma técnica de imagem denominada tomografia computadorizada quantitativa periférica, utilizando o osso rádio como referência. Esses autores observaram que microarquitetura cortical e medular desse osso estava alterada e que essas alterações estavam correlacionadas com a diminuição da DMO vista através da DXA e que modalidades de exames de imagem mais simples são importantes no rastreio de alterações osteoporóticas.

É bem sabido que o avanço da idade é um fator que deve ser levado em consideração quando se trata de redução da DMO, uma vez que o *turnover* ósseo se torna acelerado após os 40 anos de idade, principalmente em mulheres pós-menopausa (Lane, 2006). Entretanto, no presente estudo não foi possível estabelecer associação estatisticamente significativa entre a idade e os valores do índice de Klemetti e, tampouco, com as proteínas estudas. Esse é um dado que se justifica, possivelmente, ao tamanho da amostra. Não há estudos que comparem o perfil das proteínas estudadas com o avanço da idade. Por outro lado, Toshima et al. (2018) mostrou que a osteopenia em pacientes cirróticos pode ser avaliada através de tomografia computadorizada de vértebras e que está relacionada com o avanço da idade.

Também é relatado que a redução da DMO é um evento tardio na cirrose hepática, onde as alterações morfológicas e qualitativas do esqueleto se estabelecem em indivíduos com longo tempo de duração da mesma (Karoli et al., 2016). No presente estudo foi possível observar uma ampla faixa de tempo de espera na fila do transplante, que variou de 1 até 75 meses, e não foi possível encontrar relação estatisticamente significativa com as proteínas estudadas ou com o índice de Klemetti.

Aqui não foi possível estabelecer uma relação entre as proteínas em saliva e sangue com as etiologias da cirrose hepática, um fato que se deve provavelmente ao tamanho da amostra. Todavia, algumas etiologias da cirrose têm sido associadas com alterações no metabolismo ósseo de um modo mais evidente, como é o caso da cirrose alcoólica, da hepatite C e das doenças hepáticas colestáticas (Danford et al., 2019). Além do fato de o abuso de álcool ser, por si só, um fator de risco independente para osteoporose e fratura, na cirrose alcoólica outros fatores estão associados com a redução da DMO, entre eles a má nutrição e o prejuízo na absorção intestinal de cálcio. García-Valdecasas-Campelo et al. (2006) mostrou que pacientes com doença hepática alcoólica apresentavam maiores valores de OPG, TNF-α e IL-6 no sangue quando comparados com pacientes saudáveis; todavia os autores não encontraram relação desse perfil de proteínas com a DMO, a qual foi avaliada através de densitometria de vértebra lombar. Na hepatite C acredita-se que o estado de inflamação sistêmica influencie no desequilíbrio da homeostasia óssea e que as terapias antivirais empregadas restabeleçam esse equilíbrio (Danford et al., 2019). Uma meta-análise conduzida recentemente mostrou que pacientes infectados cronicamente pelo vírus da hepatite C apresentam 65% de chances de desenvolver osteoporose quando comparado a indivíduos saudáveis (Wijarnpreecha et al., 2017). Porém, o perfil de diferentes citocinas envolvidas no metabolismo ósseo de pacientes infectados pelo vírus C é bastante variável e são poucos os estudos que avaliam as proteínas RANKL e OPG no sangue desses pacientes e, ainda assim, com resultados conflitantes (Pelazas-González et al., 2013). Nas doenças hepáticas colestáticas, acredita-se que a hiperbilirrubinemina afete diretamente a função dos osteoblastos. Guañabens et al. (2009) mostrou, por exemplo, que pacientes com cirrose biliar primária apresentavam valores elevados de OPG e reduzidos de RANKL no sangue, quando comparados com o grupo controle, evidenciando o desequilíbrio existente nessa via.

Nesse estudo constatou-se que não havia correlação entre as proteínas estudas em sangue e saliva, demonstrando que essas proteínas de comportam de modo diferente dos fluidos analisados. Em acréscimo, pacientes com C2 e C3 apresentavam significativamente maiores valores de RANKL e OPG na saliva, todavia essa relação não foi encontrada quando se comparou com as proteínas em sangue. É importante ressaltar que a osteoporose é uma condição sistêmica e, na ausência de correlação entre as proteínas nos fluidos analisados, se torna difícil estabelecer uma relação de causa-efeito entre as alterações ósseas visualizadas na radiografia panorâmica e o perfil de citocinas na saliva. Para explicar esse aumento de citocinas inflamatórias e de metabolismo ósseo em saliva, sugere-se a coexistência de doenças inflamatórias em cavidade oral, como a doença periodontal, uma condição frequente em pacientes cirróticos. O estudo conduzido por Di Profio et al (2018) revelou que pacientes com cirrose apresentam maior prevalência, extensão e severidade de periodontite do que pacientes saudáveis, apresentando maior perda de inserção e maiores médias de recessão gengival. Por outro lado, quando há aumento significativo de proteínas relacionadas com a reabsorção óssea em nível sérico, se torna mais plausível estabelecer uma relação entre esses fluidos e cavidade oral, com é o caso do estudo de Panezai et al (2018) o qual mostrou que a doença periodontal em pacientes com artrite reumatoide é capaz de influenciar a expressão sérica de RANKL e OPG. Assim, no presente trabalho, presume-se que os valores elevados de RANKL e OPG em saliva de pacientes cirróticos estão provavelmente relacionados com o microambiente inflamatório local e não com a osteoporose propriamente dita.

Este estudo apresenta algumas limitações que necessitam ser abordadas. Por se tratar de um trabalho de corte transversal, os resultados aqui obtidos carecem de estudos futuros com delineamento longitudinal que objetivem testar as mesmas hipóteses e tracem relações de causa-efeito entre a presença das proteínas aqui estudadas com a presença de alterações sugestivas de osteoporose ao longo da história natural da cirrose. Outro aspecto a ser mencionado é o tamanho da amostra que ainda é um número tímido, entretanto, esse estudo parece ser o primeiro a testar as hipóteses já referidas. Também não foi possível realizar a densitometria óssea naqueles pacientes com o índice da cortical mandibular C2 e C3, todavia, as recentes evidências referem que a radiografia panorâmica funciona como ferramenta de rastreio para a redução da DMO. Por último, destaca-se que

não foi possível estratificar os pacientes por sexo e idade, assim, mulheres em estágio pós-menopausa também foram incluída, mesmo sendo poucos os pacientes nessa condição (n=6).

7 CONCLUSÃO

As proteínas RANKL, OPG, IL-1β, IL-6 e TNF-α se comportam de maneira diferente na saliva e no sangue. Valores elevados de RANKL e OPG em saliva estão relacionados com maiores índices sugestivos de osteoporose em pacientes cirróticos, todavia, propõe-se que esse aumento ocorra devido ao microambiente inflamatório local e não a osteoporose propriamente dita.

REFERÊNCIAS[1]

Pinzani M. Pathophysiology of Liver Fibrosis. Dig Dis. 2015;33(4):492-7.

Luxon BA. Bone disorders in chronic liver diseases. Curr Gastroenterol Rep. 2011 Feb;13(1):40-8.

Moschen AR, Kaser A, Stadlmann S, Millonig G, Kaser S, Mühllechner P, HabiorA, Graziadei I, Vogel W, Tilg H. The RANKL/OPG system and bone mineral density in patients with chronic liver disease. J Hepatol. 2005 Dec;43(6):973-83.

Guañabens N, Parés A.Osteoporosis in liver cirrhosis. Gastroenterol Hepatol. 2012 Jun-Jul;35(6):411-20. doi: 10.1016/j.gastrohep.2012.01.017.

Tyrovola JB. The "Mechanostat" Principle and the Osteoprotegerin-OPG/RANKL/RANK System PART II. The Role of the Hypothalamic-Pituitary Axis. J Cell Biochem. 2017 May;118(5):962-966.

Walsh MC, Choi Y. Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. Front Immunol. 2014 Oct 20;5:511.

Tan W, Zhang W, Strasner A, Grivennikov S, Cheng JQ, Hoffman RM, Karin M. Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling. Nature. 2011 Feb 24;470(7335):548-53.

Remuzgo-Martínez S, Genre F, López-Mejías R, Ubilla B, Mijares V, Pina T, Corrales A, Blanco R, Martín J, Llorca J, González-Gay MA. Expression of osteoprotegerin and its ligands, RANKL and TRAIL, in rheumatoid arthritis. Sci Rep. 2016 Jul 12;6:29713.

Yasuda H. RANKL, a necessary chance for clinical application to osteoporosis and cancer-related bone diseases. World J Orthop. 2013 Oct 18;4(4):207-17.
Santos LA, Romeiro FG. Diagnosis and Management of Cirrhosis-Related Osteoporosis. Biomed Res Int. 2016;2016:1423462.

Del Campo JA, Gallego P, Grande L. Role of inflammatory response in liver diseases: Therapeutic strategies. World J Hepatol. 2018 Jan 27;10(1):1-7.

[1] De acordo com Estilo Vancouver.

Bonnel AR, Bunchorntavakul C, Reddy KR. Immune dysfunction and infections in patients with cirrhosis. Clin Gastroenterol Hepatol. 2011 Sep;9(9):727-38.

Calciolari E, Donos N, Park JC, Petrie A, Mardas N. Panoramic measures for oral bone mass in detecting osteoporosis: a systematic review and meta-analysis. J Dent Res. 2015;94(3 Suppl):17S-27S.

Taguchi A, Sanada M, Krall E, Nakamoto T, Ohtsuka M, Suei Y, Tanimoto K, Kodama I, Tsuda M, Ohama K. Relationship between dental panoramic radiographic findings and biochemical markers of bone turnover. J Bone Miner Res. 2003 Sep;18(9):1689-94.

Vlasiadis KZ, Damilakis J, Velegrakis GA, Skouteris CA, Fragouli I, Goumenou A, Matalliotakis J, Koumantakis EE. Relationship between BMD, dental panoramic radiographic findings and biochemical markers of bone turnover in diagnosis of osteoporosis. Maturitas. 2008 Mar 20;59(3):226-33.

Nagi R, Devi B K Y, Rakesh N, Reddy SS, Santana N, Shetty N. Relationship between femur bone mineral density, body mass index and dental panoramic mandibular cortical width in diagnosis of elderly postmenopausal women with osteoporosis. J Clin Diagn Res. 2014 Aug;8(8):ZC36-40.

Balto KA, Gomaa MM, Feteih RM, AlAmoudi NM, Elsamanoudy AZ, Hassanien MA, Ardawi MM. Dental Panoramic Radiographic Indices as a Predictor of Osteoporosis in Postmenopausal Saudi Women. J Bone Metab. 2018 Aug;25(3):165-173.

Nusrat S, Khan MS, Fazili J, Madhoun MF. Cirrhosis and its complications: evidence based treatment. World J Gastroenterol. 2014 May 14;20(18):5442-60.
Møller S, Bendtsen F. Cirrhotic Multiorgan Syndrome. Dig Dis Sci. 2015 Nov;60(11):3209-25.

D'Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. J Hepatol. 2006 Jan;44(1):217-31.

Garcia-Tsao G, Friedman S, Iredale J, Pinzani M. Now there are many (stages) where before there was one: In search of a pathophysiological classification of cirrhosis. Hepatology. 2010 Apr;51(4):1445-9.

Nakchbandi IA. Osteoporosis and fractures in liver disease: relevance, pathogenesis and therapeutic implications. World J Gastroenterol. 2014 Jul 28;20(28):9427-38.

Yadav A, Carey EJ. Osteoporose na doença hepática crônica. Nutr Clin Pract. 2013 Feb; 28 (1): 52-64.

Karoli Y, Karoli R, Fatima J, Manhar M. Study of Hepatic Osteodystrophy in Patients with Chronic Liver Disease. J Clin Diagn Res. 2016 Aug;10(8):OC31-4.

Alcalde Vargas A, Pascasio Acevedo JM, Gutiérrez Domingo I, García Jiménez R, Sousa Martín JM, Ferrer Ríos MT, Sayago Mota M, Giráldez Gallego A, Gómez Bravo MA. Prevalence and characteristics of bone disease in cirrhotic patients under evaluation for liver transplantation. Transplant Proc. 2012 Jul-Aug;44(6):1496-8.

Lupoli R, Di Minno A, Spadarella G, Ambrosino P, Panico A, Tarantino L, Lupoli G, Lupoli G, Di Minno MN. The risk of osteoporosis in patients with liver cirrhosis: a meta-analysis of literature studies. Clin Endocrinol (Oxf). 2016 Jan;84(1):30-8.

Liang J, Meng WD, Yang JM, Li SL, Zhong MN, Hou XX, Wang R, Long YY, Bao LX, Bao M. The association between liver cirrhosis and fracture risk: A systematic review and meta-analysis. Clin Endocrinol (Oxf). 2018 Oct;89(4):408-413.

Montomoli J, Erichsen R, Gammelager H, Pedersen AB. Liver disease and mortality among patients with hip fracture: a population-based cohort study. Clin Epidemiol. 2018 Aug 21;10:991-1000.

Handzlik-Orlik G, Holecki M, Wilczyński K, Duława J. Osteoporosis in liver disease: pathogenesis and management. Ther Adv Endocrinol Metab. 2016 Jun;7(3):128-35.

Udomsinprasert W, Jittikoon J. Vitamin D and liver fibrosis: Molecular mechanisms and clinical studies. Biomed Pharmacother. 2019 Jan;109:1351-1360.

Kizilgul M, Ozcelik O, Delibasi T. Bone health and vitamin D status in alcoholic liver disease. Indian J Gastroenterol. 2016 Jul;35(4):253-9.

Kumar R, Kumar P, Saxena KN, Mishra M, Mishra VK, Kumari A, Dwivedi M, Misra SP. Vitamin D status in patients with cirrhosis of the liver and their relatives-A case control study from North India. Indian J Gastroenterol. 2017 Jan;36(1):50-55.

Tsiaras WG, Weinstock MA. Factors influencing vitamin D status. Acta Derm Venereol. 2011;91:115–24.

Martin TJ, Sims NA. RANKL/OPG; Critical role in bone physiology. Rev Endocr Metab Disord. 2015 Jun;16(2):131-9.

Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. Nature. 1997 Nov 13;390(6656):175-9.

Walsh MC, Choi Y. Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. Front Immunol. 2014 Oct 20;5:511.

Pietschmann P, Mechtcheriakova D, Meshcheryakova A, Föger-Samwald U, Ellinger I. Immunology of Osteoporosis: A Mini-Review. Gerontology. 2016;62(2):128-37.

Dirchwolf M, Podhorzer A, Marino M, Shulman C, Cartier M, Zunino M, Paz S, Muñoz A, Bocassi A, Gimenez J, Di Pietro L, Romero G, Fainboim H, Fainboim L. Immune dysfunction in cirrhosis: Distinct cytokines phenotypes according to cirrhosis severity. Cytokine. 2016 Jan;77:14-25.

Liu H, Luo T, Tan J, Li M, Guo J. 'Osteoimmunology' Offers New Perspectives for the Treatment of Pathological Bone Loss. Curr Pharm Des. 2017;23(41):6272-6278. Rahnama M, Jastrzębska I, Jamrogiewicz R, Kocki J. IL-1α and IL-1β levels in blood serum and saliva of menopausal women. Endocr Res. 2013;38(2):69-76.

Zhu S, He H, Gao C, Luo G, Xie Y, Wang H, Tian L, Chen X, Yu X, He C. Ovariectomy-induced bone loss in TNFα and IL6 gene knockout mice is regulated by different mechanisms. J Mol Endocrinol. 2018 Apr;60(3):185-198.

Kanis JA, Burlet N, Cooper C, Delmas PD, Reginster JY, Borgstrom F, Rizzoli R; European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO). European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. Osteoporos Int. 2008 Apr;19(4):399-428.

Clò A, Gibellini D, Damiano D, Vescini F, Ponti C, Morini S, Miserocchi A, Musumeci G, Calza L, Colangeli V, Viale P, Re MC, Borderi M. Calcaneal quantitative ultrasound (QUS) and dual X-ray absorptiometry (DXA) bone analysis in adult HIV-positive patients. New Microbiol. 2015 Jul;38(3):345-56.

Frost ML, Blake GM, Fogelman I. Quantitative ultrasound and bone mineral density are equally strongly associated with risk factors for osteoporosis. J Bone Miner Res. 2001 Feb;16(2):406-16.

Munhoz L, Aoki EM, Cortes ARG, de Freitas CF, Arita ES. Osteoporotic alterations in a group of different ethnicity Brazilian postmenopausal women: An observational study. Gerodontology. 2018 Jun;35(2):101-109.

Horner K, Devlin H, Alsop CW, Hodgkinson IM, Adams JE. Mandibular bone mineral density as a predictor of skeletal osteoporosis. Brit J of Radiol. 1996; 1019-1025. Klemetti E, Kolmakov S, Kröger H. Pantomography in assessment of the osteoporosis risk group. Scand J Dent Res. 1994;102:68-72.

Ishii K, Taguchi A, Nakamoto T, Ohtsuka M, Sutthiprapaporn P, Tsuda M, Kodama I, Kudo Y, Sumida H, Suei Y, Tanimoto K. Diagnostic efficacy of alveolar boné loss of the mandible for identifying postmenopausal women with femoral osteoporosis. Dentomaxillofac Radiol. 2007 Jan;36(1):28-33.

Navabi N, Motaghi R, Rezazadeh M, Balooch H. Relationship between Two Panoramic Radiography Indices and Bone Mineral Density of Postmenopausal Women with Osteopenia and Osteoporosis. J Dent (Shiraz). 2018 Sep;19(3):181-188.

Barngkgei I, Halboub E, Almashraqi A. Effect of bisphosphonate treatment on the jawbone: an exploratory study using periapical and panoramic radiographic evaluation. Oral Radiol. 2018 Nov 7.

Kubo R, Ariji Y, Taniguchi T, Nozawa M, Katsumata A, Ariji E. Panoramic radiographic features that predict the development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. Oral Radiol. 2018 May;34(2):151-160.

Bayrak S, Göller Bulut D, Orhan K, Sinanoğlu EA, Kurşun Çakmak EŞ, Mısırlı M, Ankaralı H. Evaluation of osseous changes in dental panoramic radiography of thalassemia patients using mandibular indexes and fractal size analysis. Oral Radiol. 2019 Jan 24.

Arita ES, Pippa MG, Marcucci M, Cardoso R, Cortes AR, Watanabe PC, Oliveira JX. Assessment of osteoporotic alterations in achondroplastic patients: a case series. Clin Rheumatol. 2013 Mar;32(3):399-402.

Taguchi A, Ohtsuka M, Tsuda M, Nakamoto T, Kodama I, Inagaki K, Noguchi T, Kudo Y, Suei Y, Tanimoto K. Risk of vertebral osteoporosis in post-menopausal women with alterations of the mandible. Dentomaxillofac Radiol. 2007 Mar;36(3):143-8.

Deguchi T, Yoshihara A, Hanada N, Miyazaki H. Relationship between mandibular inferior cortex and general bone metabolism in older adults. Osteoporos Int. 2008 Jul;19(7):935-40. Epub 2007 Dec 15.

Vlasiadis KZ, Damilakis J, Velegrakis GA, Skouteris CA, Fragouli I, Goumenou A, Matalliotakis J, Koumantakis EE. Relationship between BMD, dental panoramic radiographic findings and biochemical markers of bone turnover in diagnosis of osteoporosis. Maturitas. 2008 Mar 20;59(3):226-33.

Zhang CZ, Cheng XQ, Li JY, Zhang P, Yi P, Xu X, Zhou XD. Saliva in the diagnosis of diseases. Int J Oral Sci. 2016 Sep 29;8(3):133-7.

Stanescu II, Calenic B, Dima A, Gugoasa LA, Balanescu E, Stefan-van Staden RI, Baicus C, Badita DG, Greabu M. Salivary biomarkers of inflammation in systemic lupus erythematosus. Ann Anat. 2018 Sep;219:89-93.

Katsiougiannis S, Wong DT. The Proteomics of Saliva in Sjögren's Syndrome. Rheum Dis Clin North Am. 2016 Aug;42(3):449-56.

Cozma S, Dima-Cozma LC, Ghiciuc CM, Pasquali V, Saponaro A, Patacchioli FR. Salivary cortisol and α-amylase: subclinical indicators of stress as cardiometabolic risk. Braz J Med Biol Res. 2017 Feb 6;50(2):e5577.

Zygula A, Kosinski P, Zwierzchowska A, Sochacka M, Wroczynski P, Makarewicz-Wujec M, Pietrzak B, Wielgos M, Rzentala M, Giebultowicz J. Oxidative stress markers in saliva and plasma differ between diet-controlled and insulin-controlled gestational diabetes mellitus. Diabetes Res Clin Pract. 2018 Dec 6. pii: S0168-8227(18)31034-9.

Sahibzada HA, Khurshid Z, Khan RS, Naseem M, Siddique KM, Mali M, Zafar MS. Salivary IL-8, IL-6 and TNF-α as Potential Diagnostic Biomarkers for Oral Cancer. Diagnostics (Basel). 2017 Apr 9;7(2). pii: E21.

Castro T, Sabalza M, Barber C, Abrams W, Da Costa AC, De Pádua Milagres FA, Braz-Silva PH, Malamud D, Gallottini M. Rapid diagnosis of Zika virus through saliva and urine by Loop-mediated isothermal amplification (LAMP). J Oral Microbiol. 2018 Sep 3;10(1):1510712.

Bezinelli LM, Eduardo FP, de Carvalho DLC, Dos Santos Ferreira CE, de Almeida EV, Sanches LR, Esteves I, Campregher PV, Hamerschlak N, Corrêa L. Therapeutic salivary monitoring of IV busulfan in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation: a pilot study. Bone Marrow Transplant. 2017 Oct;52(10):1384-1389.

Miricescu D, Totan A, Calenic B, Mocanu B, Didilescu A, Mohora M, Spinu T, Greabu M. Salivary biomarkers: relationship between oxidative stress and alveolar bone loss in chronic periodontitis. Acta Odontol Scand. 2014 Jan;72(1):42-7.

Fine DH, Markowitz K, Fairlie K, Tischio-Bereski D, Ferrandiz J, Godboley D, Furgang D, Gunsolley J, Best A. Macrophage inflammatory protein-1α shows predictive value as a risk marker for subjects and sites vulnerable to bone loss in a longitudinal model of aggressive periodontitis. PLoS One. 2014 Jun 5;9(6):e98541.

Tabari ZA, Azadmehr A, Tabrizi MA, Hamissi J, Ghaedi FB. Salivary soluble receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin ratio in periodontal disease and health. J Periodontal Implant Sci. 2013 Oct;43(5):227-32.

Behfarnia P, Saied-Moallemi Z, Javanmard SH, Naseri R. Serum, saliva, and GCF concentration of RANKL and osteoprotegerin in smokers versus nonsmokers with chronic periodontitis. Adv Biomed Res. 2016 Apr 21;5:80.

Ochanji AA, Matu NK, Mulli TK. Association of salivary RANKL and osteoprotegerin levels with periodontal health. Clin Exp Dent Res. 2017 Apr 12;3(2):45-50.

McGehee JW Jr, Johnson RB. Biomarkers of bone turnover can be assayed from human saliva. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2004 Mar;59(3):196-200.

Terracciano R, Migliaccio V, Savino R, Pujia A, Montalcini T. Association between low bone mineral density and increased α-defensin in salivary fluid among postmenopausal women. Menopause. 2013 Dec;20(12):1275-9.

Pereira IF, Brasileiro CB, Kleperon NP, Abreu MHNG, Silva TAD, Mesquita RA, Amaral TMP. Comparative study of oral and salivary parameters in patients with and without loss of bone mass. Braz Oral Res. 2018 Jun 7;32:e54.

Wakolbinger R, Muschitz C, Scheriau G, Bodlaj G, Kocijan R, Feichtinger X, Schanda JE, Haschka J, Resch H, Pietschmann P. Bone microarchitecture and bone turnover in hepatic cirrhosis. Osteoporos Int. 2019 Jun;30(6):1195-1204.

Lane NE. Epidemiology, etiology, and diagnosis of osteoporosis. Am J Obstet Gynecol. 2006 Feb;194(2 Suppl):S3-11.

Toshima T, Yoshizumi T, Ikegami T, Harada N, Itoh S, Mano Y, Motomura T, Soejima Y, Maehara Y. Impact of Osteopenia in Liver Cirrhosis: Special Reference to Standard Bone Mineral Density with Age. Anticancer Res. 2018 Nov;38(11):6465-6471.

Danford CJ, Trivedi HD, Bonder A. Bone Health in Patients With Liver Diseases. J Clin Densitom. 2019 Jan 18. pii: S1094-6950(18)30253-1.

García-Valdecasas-Campelo E, González-Reimers E, Santolaria-Fernández F, De La Vega-Prieto MJ, Milena-Abril A, Sánchez-Pérez MJ, Martínez-Riera A, Gómez-Rodríguez Mde L. Serum osteoprotegerin and RANKL levels in chronic alcoholic liver disease. Alcohol Alcohol. 2006 May-Jun;41(3):261-6.

Wijarnpreecha K, Thongprayoon C, Panjawatanan P, Phatharacharukul P, Ungprasert P. Hepatitis C virus infection and risk of osteoporosis: A meta-analysis. Saudi J Gastroenterol. 2017 Jul-Aug;23(4):216-221.

Pelazas-González R, González-Reimers E, Alemán-Valls MR, Santolaria-Fernández F, López-Prieto J, González-Díaz A, Gómez-Sirvent JL, de la Vega-Prieto MJ. Bone alterations in hepatitis C virus infected patients. Eur J Intern Med. 2013 Jan;24(1):92-6.

Guañabens N, Enjuanes A, Alvarez L, Peris P, Caballería L, Jesús Martínez de Osaba M, Cerdá D, Monegal A, Pons F, Parés A. High osteoprotegerin serum levels in primary biliary cirrhosis are associated with disease severity but not with the mRNA gene expression in liver tissue. J Bone Miner Metab. 2009;27(3):347-54.

Di Profio B, Inoue G, Marui VC, de França BN, Romito GA, Ortega KL, Holzhausen M, Pannuti CM. Periodontal status of liver transplant candidates and healthy controls. J Periodontol. 2018 Dec;89(12):1383-1389.

Panezai J, Ghaffar A, Altamash M, Engström PE, Larsson A. Periodontal disease influences osteoclastogenic bone markers in subjects with and without rheumatoid arthritis. PLoS One. 2018 Jun 11;13(6):e0197235.

APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

"Avaliação de compostos nitrogenados na saliva de pacientes cirróticos: Método auxiliar no diagnóstico de encefalopatia hepática."

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Karem López Ortega

INSTITUIÇÃO: Faculdade de Odontologia da USP – Disciplina de Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes com Necessidades Especiais.

ENDEREÇO: Avenida Lineu Prestes 2227.Cidade Universitária. São Paulo, SP.
CEP: 05508-900
TELEFONE: (011) 30917838

Iniciais do participante da pesquisa:.....|__|__|__|__|__|__|

Data de nascimento do participante da pesquisa:.....|__|__|- |__|__|-|__|__|__|__|

Número do participante da pesquisa: :.....|__|__|__|__|__|__|__|__|__|

Rubrica do participante da pesquisa	Rubrica do investigador
_____	_____

INFORMAÇÕES GERAIS

Este termo tem a finalidade de convidar você a participar de forma voluntária do projeto de pesquisa "Avaliação de compostos nitrogenados na saliva de pacientes cirróticos: Método auxiliar no diagnóstico de encefalopatia hepática" a ser desenvolvido pela aluna de doutorado Nathália Tuany Duarte, sob orientação da Profa. Dra. Karem López Ortega que poderão se contatadas pelos telefones (011) 984589564 e (011) 30917838 respectivamente.

Esse estudo tem o objetivo de verificar se a análise salivar pode ser útil para descobrir se o participante da pesquisa apresenta ou não alterações cerebrais por problema de fígado (encefalopatia hepática) através da análise de substâncias da saliva que tenham nitrogênio. Sabe-se que algumas dessas substâncias se encontram aumentados no sangue de pessoas com encefalopatia hepática, mas nada se sabe com relação às mesmas substâncias na saliva.

A participação neste estudo é voluntária. Para que você decida sobre a sua participação no estudo, algumas informações são necessárias para compreendê-lo. Este documento (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) contém todas as informações sobre o estudo.

Não será recebido ou efetuado nenhum pagamento pela sua participação na pesquisa, nem para a realização dos exames laboratoriais.

Caso aconteça algo que prejudique a sua saúde durante algum procedimento que esteja relacionado com sua participação no estudo, é garantido pela lei brasileira que você receba indenizações de acordo com o dano ou prejuízo causado durante a pesquisa.

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

Fica claro que você terá o direito de não aceitar participar da pesquisa ou de interromper a sua participação a qualquer momento sem prejuízo de qualquer benefício que esteja recebendo.

DESCRIÇÃO DO ESTUDO

O participante da pesquisa será entrevistado pelo pesquisador, para que seja preenchido um questionário com perguntas pessoais (sexo, data de nascimento), bem como sobre a saúde geral (história médica) e bucal (cáries e problemas gengivais)

A avaliação da cavidade bucal será feita pelo mesmo pesquisador para a detecção de doença periodontal (gengiva) e presença de cáries.

Rubrica do participante da pesquisa	Rubrica do investigador
_____	_____

Serão coletadas amostras de saliva e amostra sanguínea de todos os indivíduos dessa pesquisa para avaliar os compostos nitrogenados, de forma que:

- As coletas de saliva e de sangue serão realizadas a cada 3 meses, de forma a completar pelo menos 3 coletas.
- Caso seja descoberto que o participante da pesquisa tem encefalopatia hepática, as coletas iniciais deverão ser feitas no momento mais próximo ao do diagnóstico.

BENEFÍCIOS

Os participantes da pesquisa possivelmente não terão benefícios diretos decorrentes da pesquisa. Entretanto, se a ideia principal do estudo for confirmada, ou seja, se a saliva for útil para descobrir se o participante da pesquisa apresenta encefalopatia hepática, isso poderá contribuir futuramente para o diagnóstico precoce da encefalopatia hepática em pacientes cirróticos.

RISCOS E DESCONFORTOS

Os riscos e desconfortos do preenchimento do questionário, avaliação bucal e coleta de saliva serão mínimos. Com relação à coleta de sangue, há risco de formação de uma mancha roxa temporária no local da coleta, como em qualquer exame de sangue.

CONFIDENCIALIDADE DOS DADOS

A privacidade de quem participa de pesquisa é muito importante. Todas as informações coletadas neste estudo serão mantidas confidenciais. Você terá acesso aos resultados dos exames realizados durante o estudo e, caso os resultados deste estudo sejam publicados, não haverá qualquer informação ou dado que possa identificá-lo(a).

Os registros clínicos que possam identificá-lo (a) serão mantidos em sigilo, conforme exigido pela lei. Exceto pelo nome neste documento, que também é confidencial, você não será identificado por número de RG ou CPF, endereço, número de telefone ou qualquer outro dado que o(a) identifique diretamente nos registros do estudo que forem revelados para fora da Faculdade de Odontologia da USP.

Rubrica do participante da pesquisa	Rubrica do investigador
_____	_____

SOBRE SUA PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA NO ESTUDO E SEU DIREITO DE RECUSAR OU DESISITIR DE PARTICIPAR

A decisão de participar deste estudo é totalmente voluntária. Você deve decidir o que é melhor com base nas explicações que deverão ser fornecidas pelo pesquisador ou por quaisquer outras informações sobre o estudo.

Uma vez que decidir entrar no estudo, você tem direito de desistir de participar a qualquer momento sem necessidade de justificar seus motivos. A desistência não afetará o tratamento que você recebe rotineiramente no CAPE. Se desistir de participar do estudo, você poderá receber outros tipos de tratamento que serão indicados pelo dentista. Caso o projeto de pesquisa seja interrompido pelos pesquisadores, você receberá a assistência que for adequada de forma gratuita, pelo tempo que for necessário.

FUTUROS ESTUDOS E ANÁLISES DA AMOSTRA

Existem outras substâncias que podem estar presentes nas amostras coletadas das pessoas com cirrose e por isso ela poderá ser necessária para outros estudos, desta forma:

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

( ) SIM AUTORIZO a utilização de dados ou material biológico (saliva e sangue) em outra pesquisa.

Para utilizar os dados ou material biológico (saliva e sangue) em outra pesquisa você quer ser consultado?

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

Você poderá ter todas as informações que quiser sobre esta pesquisa ou pesquisas futuras que envolvam suas amostras.

Rubrica do participante da pesquisa	Rubrica do investigador
_____	_____

INFORMAÇÕES DE CONTATO

A qualquer momento durante o andamento do estudo a pesquisadora Nathália Tuany Duarte estará disponível para dúvidas e esclarecimentos pelo telefone (11) 984589564.

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), sendo o horário de funcionamento de segunda a sexta- feira das 8h às 17h (exceto feriados e recesso universitário). O Comitê é um colegiado interdisciplinar e independente, de relevância pública, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro dos padrões éticos. (Resolução CNS nº 466 de 2012).

Rubrica do participante da pesquisa	Rubrica do investigador
_____	_____

CONSENTIMENTO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA

Sua assinatura indica que você decidiu participar da pesquisa como voluntário e que leu e entendeu todas as informações acima explicadas.

Este documento foi elaborado em duas vias de igual teor sendo uma do pesquisador responsável e a outra do participante da pesquisa.

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 Nathália Tuany Duarte caso tenha alguma dúvida. Eu concordo voluntariamente em participar do estudo "Avaliação de compostos nitrogenados na saliva de pacientes cirróticos: Método auxiliar no diagnóstico de encefalopatia hepática".

_____ _____

Assinatura do participante da pesquisa Assinatura do pesquisador

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Rubrica do participante da pesquisa	Rubrica do investigador
_____	_____

APÊNDICE B – Descrição dos valores individuais (pg/mL) das proteínas estudadas em sangue.

Participante	RANKL	OPG	Ratio rankl/opg	IL-1β	IL-6	TNF-α
1	0,36	289	0,001	0.39	5.32	1.09
2	99,85	304	0,328	1.39	18.67	2.18
3	2,71	904	0,002	0.46	20.53	2.18
4	1,52	442	0,003	0.41	20.95	1.04
5	38,1	557	0,068	0.18	5.32	2.35
6	2,32	218	0,01	0.21	2.4	1.12
7	0,84	463	0,001	0.33	4.46	1.15
8	0,63	822	0	0.81	18.67	3.53
9	0,97	235	0,004	0.76	7.71	1.61
10	2,47	454	0,005	0.71	5	2.09
11	3,85	199	0,019	0.46	4.04	0.94
12	0,57	221	0,002	1.02	14.97	2.13
13	2,97	442	0,006	0.28	29.77	2.45
14	1,1	578	0,001	0.29	9.79	0.4
15	1,41	503	0,002	0.29	9.03	1.92
16	66,48	779	0,085	6.52	53.05	2.79
17	5,39	379	0,014	1.07	10.01	3.28
18	3,25	457	0,007	0.52	14.01	2.28
19	4,76	382	0,012	0.33	3.31	1.45
20	3,75	390	0,009	0.26	172	1.77
21	1,3	373	0,003	0.33	2.8	2.3
22	1,58	223	0,007	0.29	7.5	1.01
23	1,41	410	0,003	0.6	19.5	1.8
24	11,18	366	0,03	0.37	10.34	15.94
25	0,57	657	0	0.52	60.26	1.18
26	1,35	625	0,002	1.07	5	1.96
27	1,3	516	0,002	0.33	28.3	2.08
28	2,63	232	0,011	0.42	4.68	2.69
29	0,88	830	0,001	0.22	11.32	1.78
30	0,84	568	0,001	0.29	1.83	3.43
31	0,38	1244	0	0.32	9.9	2.89
32	5,79	426	0,013	0.45	3.41	1.65
33	0,31	678	0	0.39	85.48	5.26
34	2,47	225	0,01	0.36	16.57	2.88
35	1,41	535	0,002	0.46	14.87	2.95
36	0,97	191	0,005	0.39	15.4	2.27
37	0,36	224	0,001	0.34	5	1.69
38	5	447	0,011	0.59	2.4	0.92
MÉDIA	7,45	468,10	0,018	0,64	19,30	2,43

APÊNDICE C – Descrição dos valores individuais (pg/mL) das proteínas estudadas em saliva

Participante	RANKL	OPG	Ratio rankl/opg	IL-1β	IL-6	TNF-α
1	8,11	358	0,022	11.44	19.4	1.16
2	13,19	780	0,016	240	464	8.38
3	32,4	1161	0,027	34.79	73.79	6.05
4	4,4	462	0,009	106	26.61	15.39
5	20,69	116	0,178	5.93	25.72	4.07
6	162	274	0,591	119	42.82	4.7
7	112	139	0,805	50.2	70.48	4.21
8	47,67	80.25	0,594	13.47	35.36	3.6
9	59	155	0,389	66.24	29.77	2.98
10	34,12	60.42	0,564	3.73	30.36	4.28
11	153	260	0,588	46.05	79.11	10.22
12	155	116	1,336	118	17.52	2.59
13	30,07	1903	0,015	15.18	83.88	7.27
14	3,35	117	0,028	46.26	103	5.04
15	121	221	0,547	3.69	23.7	1.5
16	82,72	211	0,392	23.17	31.91	2.54
17	98,89	81.05	1,22	7.16	33.16	3.87
18	1122	964	1,163	8.55	154	16.21
19	29,1	135	0,215	101	19.5	2.97
20	23,97	381	0,062	126	20.33	2.22
21	25,71	169	0,152	27.39	83.07	4.62
22	6,36	85.15	0,074	3.36	20.43	4.99
23	23,12	297	0,077	28.21	30.16	2.82
24	22,57	123	0,183	16.92	38.84	4.36
25	2,89	803	0,003	7.86	37.15	1.36
26	5,52	44.65	0,123	6.87	20.53	1.96
27	21,48	108	0,198	26.58	56.55	2.69
28	27,53	306	0,089	106	47.63	8.87
29	11,18	192	0,058	14.12	166	0.94
30	52,94	57.77	0,916	1.07	6.3	0.68
31	7,28	193	0,037	6.65	10.34	7.2
32	6,22	227	0,027	88.09	126	3.51
33	0,27	337	0	73.94	17.09	23.82
34	6,97	1063	0,006	58.06	21.36	11.13
35	29,1	326	0,089	49.19	325	2.29
36	190	329	0,577	30.48	133	15.06
37	4,29	337	0,011	22.2	19.71	18.13
38	72,84	50.85	1,432	31.96	28.79	3.13
MÉDIA	74,44	342,71	0,337	45,91	67,69	5,97

ANEXO A – Parecer Comitê de Ética em Pesquisa

USP - FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO

PlataForma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação dos níveis séricos e salivares de RANKL, OPG, OPN, IL-1b, IL-6, TNF-a em pacientes com cirrose hepática e sua relação com índices radiomorfométricos em radiografias panorâmicas.

Pesquisador: Karem López Ortega

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 03205218.2.0000.0075

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.065.652

Apresentação do Projeto:

Alterações no metabolismo mineral ósseo podem ocorrer ao longo do curso de diversas doenças crônicas, tal qual na cirrose hepática (CH) o que pode levar vários pacientes ao desenvolvimento de quadros de osteopenia ou mesmo osteoporose. Diversos marcadores moleculares têm sido empregados para acessar o grau de severidade do comprometimento ósseo nessas condições, entre eles proteínas vinculadas ao metabolismo ósseo mineral, tais como a Osteoprotegerina (OPG), Receptor Ativador do fator de transcrição NFkB (RANK), Ligante do Receptor Ativador do fator de transcrição NFkB (RANKL) e osteopontina, bem como citocinas pró-inflamatórias como a interleucina (IL)-1, IL-6 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF-). Por outro lado, índices radiomorfométricos mensurados em radiografias panorâmicas são ferramentas de rastreio bastante úteis para sugerir alterações osteoporóticas. Assim, o objetivo desse estudo é o de avaliar a presença e o significado das proteínas RANKL, OPG e osteopontina, IL-1, IL-6 e TNF-) no fluido salivar e no sangue de pacientes com CH e comparar com índices radiomorfométricos sugestivos de alterações osteoporóticas observadas em radiografias panorâmicas.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a presença e o significado das proteínas relacionadas ao metabolismo ósseo mineral (RANKL, OPG e osteopontina) e de proteínas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF-) no fluido salivar e no sangue de pacientes cirróticos.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

Objetivos Específicos

• Comparar os níveis séricos de RANKL, OPG, osteopontina, IL-1, IL-6, TNF- da saliva e sangue de pacientes cirróticos com as complicações da CH e presença de co-morbidades.

• Comparar os níveis séricos de RANKL, OPG, osteopontina, IL-1, IL-6, TNF- da saliva e sangue de pacientes cirróticos com índices radiomorfométricos aferidos em radiografias panorâmicas e sugestivos de alterações osteoporóticas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Essa investigação não oferece riscos, uma vez que todos os procedimentos serão realizados com amostras previamente colhidas e com informações presentes em banco de dados de pesquisa anterior.

Benefícios:

Essa pesquisa trará benefícios indiretos aos pacientes, uma vez que o estudo das referidas proteínas poderá ajudar a melhor entender o metabolismo ósseo de pacientes com cirrose hepática.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo observacional retrospectivo em pacientes cirróticos em fila de transplante e tem o objetivo avaliar a presença e o significado das proteínas relacionadas ao metabolismo ósseo mineral (RANKL, OPG e osteopontina) e de proteínas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF-) no fluido salivar e no sangue de pacientes cirróticos e como desfecho secundário, comparar esses dados com índices radiomorfométricos sugestivos de alterações osteoporóticas observadas em radiografias panorâmicas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados: Folha de rosto, projeto detalhado, carta do biobanco, parecer anterior do projeto de onde serão utilizadas as amostras de sangue e saliva e cronograma.

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 pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1256257.pdf	14/11/2018 11:13:01		Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRostoAssinada.pdf	14/11/2018 11:12:06	JEFFERSON DA ROCHA TENÓRIO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PESQUISAATUAL.doc	12/11/2018 14:02:54	JEFFERSON DA ROCHA TENÓRIO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biobanco.pdf	12/11/2018 14:01:22	JEFFERSON DA ROCHA TENÓRIO	Aceito
Parecer Anterior	PARECERANTERIOR.pdf	12/11/2018 13:55:42	JEFFERSON DA ROCHA TENÓRIO	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.doc	12/11/2018 13:55:27	JEFFERSON DA ROCHA TENÓRIO	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO PAULO, 07 de Dezembro de 2018

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador(a))

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br