NÍCOLLAS NUNES RABELO

**Análise molecular de DNA viral na parede de
aneurismas intracranianos rotos e não rotos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de Neurologia

Orientador:

Prof. Dr. Eberval Gadelha Figueiredo

Coorientador:

Prof. Dr. Paulo Henrique Braz da Silva

São Paulo

2021

NÍCOLLAS NUNES RABELO

**Análise molecular de DNA viral na parede de
aneurismas intracranianos rotos e não rotos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de Neurologia

Orientador:

Prof. Dr. Eberval Gadelha Figueiredo

Coorientador:

Prof. Dr. Paulo Henrique Braz da Silva

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Rabelo, Nicollas Nunes

Análise molecular de DNA viral na parede de
aneurismas intracranianos rotos e não rotos /
Nicollas Nunes Rabelo. -- São Paulo, 2021.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Neurologia.

Orientador: Eberval Gadelha Figueiredo.

Coorientador: Paulo Henrique Braz da Silva.

Descritores: 1.Aneurisma intracraniano
2.Hemorragias intracranianas 3.Hemorragia
subaracnóidea 4.Virologia 5.DNA viral 6.Torque teno
virus 7.Infecções por herpesvirus

USP/FM/DBD-076/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”.

Marcel Proust

DEDICATÓRIA

A minha mãe Márcia, meu pai Roberto e meu irmão Neiffer, vocês me ensinaram a acreditar no impossível e lutar pelos sonhos, com muita humildade e simplicidade.

A todos que acreditaram em meu trabalho principalmente os Mestres. Aos amigos invisíveis que de alguma forma sempre estiveram juntos na jornada.

Vocês me inspiraram na força de trabalho e abriram os horizontes nas possibilidades que a vida pode fornecer. Vocês são verdadeiros companheiros.

Dedico essa tese a vocês, com carinho.

AGRADECIMENTOS

Essa tese foi escrita em um momento único de nossa história mundial. A coleta das amostras foi realizada na ocasião em que já existia uma delicada situação econômica no País e logo iniciou um dos momentos mais difíceis de nossa história no qual o medo, a dúvida, perdas e reflexões passaram a existir com o contexto da pandemia. Agradeço primeiro a Deus pela vida e por diversas possibilidades que ela própria nos proporciona. Agradeço a realização deste sonho, sobretudo, por usar o ceticismo e o questionamento, como elementos essenciais para que possa sempre buscar novos caminhos e resultados mais assertivos na prática clínica.

Minha família, constituída de grandes educadores, desde a infância mostrou-me que uma das melhores ferramentas para transformar nosso meio seria pela educação. A meus avós maternos Roberta e João que, se estivessem presentes, tenho certeza de que estariam comemorando muito esta conquista. A meus avós paternos Lourdes e Manoel, que me ensinaram que a maior joia está no quanto você é capaz de aprender. Quanto mais se aprende mais se ganha.

Ao incondicional apoio de Márcia e Roberto, meus queridos pais, que sempre disseram que eu melhoraria dia a dia, quando a lágrima nos olhos corria diante de tantas dificuldades, de “não” recebidos e de incertezas dos caminhos a serem seguidos dentro da jornada. Aprendi com eles que o impossível é apenas uma opinião. Lutar, batalhar, persistir sempre com muita humildade e seguir sempre em frente. A história existe, quando é traçada por meio de um propósito e um sonho. A meu irmão Neiffer, um grande companheiro de batalhas que em todos os momentos esteve comigo apoiando-me. Crescemos e amadurecemos a jornada juntos, aprendendo desde coisas mais simples, até mesmo, compartilhando as tomadas de decisões mais difíceis.

A apresentação de uma tese é momento único que fecha um ciclo que se inicia na infância em que mesmo com “pressãozinha no peito” de não querer ir à escola por medos, meus pais foram aqueles que falaram, “meu filho, você precisa ir, passar pelas etapas, estamos com você e vamos em frente”! Hoje concluindo esta importante tese, só tenho a agradecer emocionado por todo carinho, dedicação, doação e renúncia de toda minha família.

Ao Professor Manoel Jacobsen Teixeira, por quem tenho carinho especial pela confiança e acolhimento na execução da pesquisa na FMUSP. Ao professor Eberval Gadelha Figueiredo, que demonstrou, além das qualidades de um grande Mestre, amigo, colega de especialidade, um verdadeiro Pai na Neurocirurgia, uma pessoa que, ao longo da jornada, constantemente direciona os caminhos mais nobres da educação com ensinamentos para uma vida.

Aos colaboradores do Instituto de Medicina Tropical (IMT) do Departamento de Virologia no LIM 52, Lucas, Tania e Caio que estiveram sempre muito ativos e presentes nas análises das amostras. Vocês gentilmente, acolheram-me no laboratório, meu muito obrigado. Em especial, o coorientador Professor Paulo Braz que confiou e sempre trouxe palavras motivadoras, proporcionando um cenário fértil para que pudéssemos colocar em prática todas os experimentos.

Aos colegas de *Fellowship* da Neurocirurgia Vascular do HCFMUSP Arthur, Renan e Bruno Braga, verdadeiros irmãos que a Neurocirurgia nos apresenta durante a caminhada. Amigos com quem compartilhamos momentos de dificuldade e comemoramos momentos de grandes conquistas. A Gisele Coelho que demonstrou, ao longo da caminhada, ser uma irmã de lutas, conquistas e coragem na jornada.

Aos Acadêmicos Nathalia, Guilherme, Harumy, Antonio e Leonardo Pipek, agradeço o intenso apoio nas coletas dos dados, esse gigantesco esforço rendeu uma parceria muito sólida, com muitos frutos. Em especial, ao João Paulo Telles que esteve presente de forma cordial nas discussões, análises e com muito apetite ao executar as tarefas. Ao Dan Zimelewicz

Oberman, obrigado pela disponibilidade de ter aceitado de forma gentil fazer parte desta equipe. Ao aluno André, agradeço a contribuição de sua obra de arte nos desenhos desta tese.

Ao Professor Boechart, obrigado por contribuir imensamente com seu dom estatístico durante as análises da pesquisa.

Ao colaborador Gustavo Zagatto, que, mesmo com dificuldades enfrentadas do momento Pandêmico, pôde ceder um pouco do seu talento e seu tempo para que pudéssemos desenvolver um trabalho de arte magnífico em formato de vídeo digital, parte do material desta tese. Na reta final aos colaboradores, Nilda, Ivone e Rute que contribuíram na condução dessa tese com um toque de maestria e uma elegância única. A colaboradora Michele, obrigado pela disponibilidade na organização dos dados.

A todos os residentes e médicos do HC-FMUSP que contribuíram com as coletas, Saul Almeida, Vinicius Trindade, Barbara Moraes, Francisco, Davi Solla, Danilo Quadros, Thales, Adilson, Renata e Vitor Nagai, e na radiologia o Sergio dando apoio no tocante às imagens.

No início do projeto, aos colaboradores que proporcionaram excelentes discussões, Bruna, Lídia e o Professor José Tadeu. A Professora Ida que nos acolheu no ambulatório de cefaleia.

Aos colaboradores (as) da Pós-graduação Reiko, Ester, Elizabeth, Suely e Alair, meu muito obrigado pelo apoio. Em especial, a Thais, que sempre com sua paciência, pode conduzir os caminhos dentro da pós-graduação.

Aos amigos próximos João, Julio e Cecília por sempre estarem juntos nos conselhos e por guiarem caminhos mais nobres.

A todos os pacientes que, gentilmente, concederam permissão para executarmos a pesquisa, que nos proporcionou o presente resultado.

A todos os colaboradores e à FMUSP pelo gentil acolhimento.

NORMALIZAÇÃO

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	xii
Lista de figuras.....	xiv
Lista de quadros	xv
Lista de tabelas.....	xvi
Lista de gráficos	xvii
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xx
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	6
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	8
3.1 Histórico: aneurisma intracraniano	9
3.2 Aneurismas cerebrais	10
3.3 História natural da doença.....	11
3.4 Formação, crescimento, ruptura e inflamação	12
3.5 Herpes vírus humanos (HHV).....	14
3.5.1 Alfa-herpes vírus	15
3.5.1.1 Herpes simples 1 (HSV-1)	15
3.5.1.2 Herpes simples 2 (HSV-2)	15
3.5.1.3 Vírus varicela-zoster (VZV).....	16
3.5.2 Beta-herpes vírus	16
3.5.2.1 Citomegalovírus (CMV).....	16
3.5.2.2 Herpes vírus humano-6	17
3.5.2.3 Herpes vírus humano-7	19
3.5.3 Gama-herpes vírus.....	19
3.5.3.1 Vírus Epstein-Barr.....	19
3.5.3.2 Herpes vírus humano-8	19
3.5.4 Influência dos HHVs no sistema nervoso central	20
3.5.5 Infecção por CMV e outros tipos de aneurismas	22
3.6 Torque teno vírus.....	22
3.6.1 Vias de transmissão	22

3.6.2 Distribuição geográfica	23
3.6.3 Potencial patogênico	23
3.7 Aspectos inflamatórios na gênese da formação de AI	26
3.7.1 Histopatologia da degradação da parede de AI	27
3.7.2 Degeneração da parede de AI	28
3.7.3 Inflamação da parede de AI e infiltração de células inflamatórias	28
3.7.4 O papel do endotélio e sua hemodinâmica no desencadeamento da reação inflamatória.....	29
3.7.5 Modulação de AI e sua relação com a inflamação.....	31
3.8 Envolvimento de microrganismos na formação de AI	34
4 MÉTODOS	37
4.1 Atendimento às normas éticas	38
4.2 Processo metodológico	38
4.3 Características da população	42
4.3.1 População do estudo.....	42
4.3.2 Local do estudo	43
4.3.3 Critérios de inclusão	43
4.3.4 Critérios de exclusão	43
4.4 Processamento laboratorial microbiológico das amostras	44
4.4.1 Coleta, processamento e armazenamento	44
4.4.1.1 Biologia molecular.....	45
4.4.1.1.1 Extração dos ácidos nucleicos	45
4.4.1.1.2 Avaliação da qualidade do DNA obtido	46
4.4.1.1.3 Amplificação de DNA viral e tipagem de Herpes vírus	46
4.4.1.1.4 Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição	48
4.5 Torque teno vírus.....	48
4.6 Análise estatística	49
5 RESULTADOS.....	50
5.1 Caracterização.....	51
5.2 Vírus	52
5.2.1 Características da população do estudo	52
5.2.2 Análise da população em relação ao gênero	53

5.2.3 Características das amostras de DNA viral.....	54
5.2.4 Categorização dos fatores de risco.....	56
5.2.5 Características da localização de AI na amostra e a relação com a presença de vírus	58
5.2.6 Análise da relação do vírus TTV e dos grupos de AI rotos e não rotos	59
5.2.7 Associação entre ruptura de AI e a presença de vírus	60
5.2.8 Associação entre aneurismas múltiplos com presença de vírus	61
5.3 Caracterização do único caso positivo para pan-HHV – caso ilustrativo	62
6 DISCUSSÃO	66
6.1 Limitação do estudo.....	73
7 CONCLUSÃO	75
8 ANEXOS	77
Anexo A – Parecer consubstanciado do CEP-CCAE – Projeto de Pesquisa	78
Anexo B – Parecer consubstanciado do CEP – Emenda.....	81
Anexo C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	83
Anexo D – Vídeo esquemático	86
9 REFERÊNCIAS	87
10 APÊNDICES	111
Apêndice A – Trabalho apresentado no GLOBAL NEUROSURGERY: Ask Not for Whom the Bell Tolls Virtual Symposium	112
Apêndice B – Trabalho publicado na revista <i>Hypertension</i> em 2019	113
Apêndice C – Trabalho publicado na revista <i>Journal of Neurosurgery</i> em 2019.....	114
Apêndice D - Trabalho aceito para publicação no <i>Journal of Neurosurgery</i> em 2021	115
Apêndice E - Trabalho submetido para publicação no <i>JAMA Neurology</i> em 2021	118

LISTAS

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

ACA	Artéria cerebral anterior
ACM	Artéria cerebral média
AcoA	Artéria comunicante anterior
AI	Aneurisma intracraniano
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AVC	Acidentes vasculares cerebrais
AVCH	Acidente vascular cerebral hemorrágico
AVCI	Acidente vascular cerebral isquêmico
AVE	Acidente vascular encefálico
bFGF	Fator de crescimento de fibroblasto básico
CMV	Citomegalovírus
CT	<i>Cycle threshold</i>
DM	Diabetes Mellitus
EBV	Epstein-Barr
EC	Estresse de cisalhamento
ECG	Escala de coma de <i>Glasgow</i>
EM	Esclerose múltipla
FM	Fisher modificado
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GOS	Escala <i>Glasgow outcome scale</i>
HAS	Hipertensão arterial
HC	Hospital das Clínicas
HHV	Herpes vírus humano
HHV-6	Herpes vírus humano 6
HHV-7	Herpes vírus humano 7
HHV-8	Herpes vírus humano 8
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HSA	Hemorragia subaracnóidea

HSV-1	Herpes simplex 1
HSV-2	Herpes simplex 2
IFN- γ	Interferon gama
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IMT	Instituto de Medicina Tropical
KSHV	Sarcoma de Kaposi
LIM	Laboratório de Investigação Médica
MAPKs	Proteínas quinases ativadas por mitógeno
MCP1	Proteína 1 quimioatraente
MEC	Matriz extracelular
MHC II e I	Complexo principal de histocompatibilidade
mRS	Escala de <i>Rankin</i> modificado
NK	Células <i>Natural killer</i>
NKkB	Fator de transcrição nuclear kappa B
PA	Pressão arterial
PICA	Artéria cerebelosa anteriores e posteriores
pan-HHV	Pan-Herpes vírus Humano
PCR	Cadeia da polimerase
Qpcr	Quantidade (real-time) de reação em cadeia da polimerase
SNC	Sistema nervoso central
TC	Tomografia computadorizada de crânio
TGF	Fator transformador de crescimento
TNF2	Fator de necrose tumoral
TTV	Torque teno vírus
USP	Universidade de São Paulo
VCAM1	Célula de adesão de células vasculares
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VZV	Vírus varicela-zoster
WFNS	World Federation of Neurosurgical Societies

FIGURAS

Figura 1 - Esquema representando os eventos da parede arterial durante o processo de desarranjo da citoarquitetura do vaso arterial no processo de formação de AI	13
Figura 2 - Processo metodológico com as cinco fases da pesquisa.....	39
Figura 3 - Figura esquemática representando a sequência do processo metodológico do estudo	40
Figura 4 - Seleção de pacientes estudados. Critérios de inclusão, exclusão do estudo e seleção de pacientes	42
Figura 5 - Protocolo de coleta de amostras	45
Figura 6 - Angiografia por tomografia computadorizada (TC).....	63
Figura 7 - Reconstrução de angiotomografia computadorizada de crânio e tomografia computadorizada em uma visão axial.....	64
Figura 8 - Amostra da parede de AI evidenciando HHV	65

QUADROS

Quadro 1 -	Revisão dos principais estudos que relacionam a presença de microrganismos e AI	36
Quadro 2 -	Sequência dos <i>primers</i> utilizados na reação de PCR convencional para herpes vírus.....	47
Quadro 3 -	Ciclos, temperatura e tempo da reação	47

TABELAS

Tabela 1 -	Resultado da análise de DNA de vírus nas amostras do estudo e distribuição entre grupos de aneurismas rotos e não rotos e a relação com aneurismas múltiplos e sua distribuição de acordo com os grupos	52
Tabela 2 -	Características dos pacientes categorizados por sexo, a positividade do DNA viral na parede de AI e sua relação com aneurismas múltiplos	53
Tabela 3 -	Categorização dos 35 pacientes em relação à presença de DNA viral, valores obtidos do CT (<i>cycle threshold</i>) dos pan-HHV e a carga viral de cada amostra e cópias de TTV por ng por DNA	55
Tabela 4 -	Categorização dos fatores de risco da amostra estudada, dividida entre os grupos rotos e não rotos.....	56
Tabela 5 -	Características da localização de AI na amostra e a relação com a presença de vírus, nos grupos de AI rotos, não rotos e sua relação com aneurismas múltiplos.....	58
Tabela 6 -	Frequência TTV presente em pacientes com AI rotos e não rotos	59
Tabela 7 -	Análise entre a associação de AI e a presença de vírus na parede do AI	60
Tabela 8 -	Associação de aneurismas múltiplos com vírus	61

GRÁFICOS

Gráfico 1 - Porcentagem de pacientes em relação às comorbidades, divididas nos grupos de AI rotos e não rotos.....	57
Gráfico 2 - Associação entre ruptura de AI e a presença de vírus.....	60
Gráfico 3 - Associação entre aneurismas múltiplos e presença de vírus	61

RESUMO

Rabelo NN. *Análise molecular de DNA viral na parede de aneurismas intracranianos rotos e não rotos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

Introdução: A hemorragia subaracnóidea (HSA) causada por aneurisma intracraniano (AI) pode causar, aproximadamente, 50% de mortalidade entre pacientes na faixa etária laboral. A fraqueza estrutural do vaso arterial e sua ruptura ainda são fenômenos pouco compreendidos. Recentes avanços na detecção de DNA viral e a associação de vírus com doenças vasculares fomenta a hipótese de correlacionar a presença de DNA viral na parede do vaso arterial e o AI. O vírus Torque teno vírus (TTV), recentemente, foi descrito e possui alta prevalência na população mundial. Este vírus causa uma viremia no hospedeiro, associada a diversas infecções em estados de imunossupressão do paciente, como sepse e transplante. Por outro lado, o Pan-Herpes vírus humano (pan-HHV), também é muito prevalente. A presença de vírus pode levar a uma resposta inflamatória crônica silenciosa, consequentemente, fragilizando a parede dos vasos arteriais sistêmicos a longo prazo. **Objetivo:** Avaliar a presença de DNA viral dos vírus TTV e pan-HHV em tecidos arteriais de AI rotos e não rotos. **Método:** 401 pacientes foram atendidos na Divisão de Clínica Neurocirúrgica do Hospital das Clínicas da FMUSP. Os pacientes foram divididos em dois grupos: os com aneurismas rotos (244) e os com aneurismas não rotos (177). Os vírus analisados foram pan-HHV e TTV nas amostras de tecido vascular cerebral. Os critérios de inclusão e exclusão foram aplicados para seleção da população do estudo. As amostras foram coletadas após a clipagem microcirúrgica e, em seguida, conservadas e submetidas à extração de DNA e à reação em cadeia da polimerase para TTV e pan-HHV, sendo analisados seus oito subtipos. **Resultados:** foram analisados 35 casos de pacientes elegíveis em que a coleta do material foi factível, destes 22 (62,8%) eram AIs rotos e 13 (37,2%) AIs não rotos. O gênero feminino representou a maior parte da amostra (n = 29; 82,9%), sendo 18 (81,8%) casos rotos e 11(18,2%) não rotos. Os vírus foram detectados em 16 amostras (46%). O TTV em 15 (43%) casos, sendo 10 (28,6%) rotos e cinco (14,4%) não rotos. Apenas um caso da análise revelou-se positivo para pan-HHV com detecção do Epstein-Barr (3%), sendo este paciente do sexo feminino, aneurisma roto e apresentando múltiplos aneurismas. Os aneurismas múltiplos corresponderam a 14 pacientes (40%) da amostra, sendo sete pacientes igualmente distribuídos entre os grupos roto e não roto. A associação entre presença do vírus e múltiplos aneurismas esteve presente em seis (17,2%, $p=0,781$) casos não sendo estatisticamente significativo. As associações entre a presença do vírus na parede de AI não roto e de AI roto, não se mostraram estatisticamente significativos ($p=0,507$). **Conclusão:** A presença de DNA viral de HHV e TTV na parede de AI, correspondeu a 46% da

amostra, sendo estes 68% AI rotos. Este achado sugere que a infecção crônica viral pode desempenhar papel na fisiopatologia da formação de AI como fator de risco, no que se refere à influência da alteração da citoarquitetura do vaso, em razão do processo inflamatório envolvido.

Descritores: Aneurisma intracraniano; Hemorragias intracranianas; Hemorragia subaracnóidea; Virologia; DNA viral; Torque teno vírus; Infecções por Herpesvirus.

ABSTRACT

Rabelo NN. *Molecular analysis of viral DNA in patients with ruptured and unruptured intracranial aneurysms* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2021.

Introduction: Subarachnoid hemorrhage (SAH) caused by intracranial aneurysm (IA) can cause approximately 50% mortality among patients in the working age group. The mechanism of aneurysm formation, the structural weakness of the vessel, and its rupture remain poorly understood. Recent advances in the detection of viral DNA and the association of viruses with vascular diseases justify studying the hypothesis on the relationship between viral infection and the development of cerebral aneurysmal disease. The Torque teno virus (TTV) has recently been discovered and has a high prevalence in the worldwide population. It promotes a lifelong viremia that is associated with many host infections in cases of immunosuppression. On the other hand, the human pan-Herpesvirus (pan-HHV) is also very prevalent. The presence of pathogens implies a silent chronic inflammatory response and changes in the systemic vessel wall. **Objective:** This study aims to evaluate the prevalence of viral DNA of TTV and pan-HHV in ruptured and non-ruptured IA arterial tissues. **Method:** 401 patients were admitted in the Neurosurgery Department of Hospital das Clinicas FMUSP at Instituto Central. The patients were divided into two groups: those with ruptured aneurysm (244) and those with non-ruptured aneurysm (177). The viruses analyzed were pan-HHV and TTV in samples of aneurism wall. Inclusion and exclusion criteria were applied. In the operating room, the samples were collected after microsurgical clipping. They were properly preserved and subjected to DNA extraction and polymerase chain reaction for TTV and pan-HHV (eight sub-types were analyzed). **Results:** Thirty-five cases were eligible, of which 22 (62.8%) were ruptured aneurysms, and 13 (37.2%) were non-ruptured aneurysms. The female gender represented most of the sample ($n = 29$; 82.9%), with 18 (81.8%) ruptured cases and 11 (18.2%) non-ruptured aneurysms. The virus was detected in 16 samples (46%). TTV was detected in 15 (43%) cases, 10 (28,6%) of which were ruptured and five (14,4%) were non-ruptured. Only one case of pan-HHV analysis was positive with the Epstein–Barr virus (3%). This female patient had a ruptured aneurysm and multiple aneurysms. Multiple aneurysms accounted for 14 (40%) cases, with seven patients equally distributed between the ruptured and non-ruptured groups. The association between the presence of the virus and multiple aneurysms was present in six (17.2%, $p = 0.781$) cases and was not statistically significant. The associations between the presence of the virus on the unruptured IA wall and the ruptured IA was not statistically significant ($p = 0.507$). **Conclusion:** The TTV and HHV DNA in the wall of IA, represent 46% of the sample, and 68% of ruptured IA. This finding suggests

that infection may play a role in the pathophysiology of IA as a risk factor, regarding the influence of the virus on the inflammatory process.

Descriptors: Intracranial aneurysm; Intracranial hemorrhage; Subarachnoid hemorrhage; Virology; Viral DNA; Torque teno virus; Human Herpes virus.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A doença aneurismática cerebral tem um significativo impacto na saúde da população. A prevalência de aneurisma intracraniano (AI) pode chegar de 3-5% da população adulta e é a causa de, aproximadamente, 80-85% de hemorragias subaracnóideas (HSA) não traumáticas. No sexo feminino, a prevalência é maior, correspondendo a quase 2/3 dos doentes. Até 20-30% apresentam-se como aneurismas múltiplos. A ruptura de AI está associada com 5-15% de acidente vascular cerebral hemorrágico (AVCH). HSA é a principal consequência de AI roto, com mortalidade de 30-50% e sequelas na maioria dos casos. Três a cada cinco pacientes que sobrevivem, tornam-se funcionalmente dependentes ⁽¹⁻³⁾.

O estresse hemodinâmico na parede na bifurcação arterial e o processo inflamatório podem sobrecarregar a parede do vaso, aumentando as forças de cisalhamento e estresse vascular ao longo do tempo e levar a menor resistência das camadas vasculares, com consequente fragilidade e possível formação de uma saculação e ruptura. O risco de formação e ruptura de AI pode aumentar, dependendo de fatores modificáveis e não modificáveis. Os fatores modificáveis são tabagismo, hipertensão arterial sistêmica descontrolada, uso de drogas ilícitas (um exemplo, é a cocaína), sangramento prévio de AI, abuso de álcool e uso de drogas simpatomiméticas. Os fatores não modificáveis são história familiar (definido como, pelo menos, dois parentes de primeiro grau apresentando AI) e aneurismas maiores que 7 mm de tamanho ⁽¹⁻³⁾.

A incidência aumenta com a idade, com seu pico por volta dos 50 anos. Outras características não modificáveis são maior prevalência no sexo feminino, razão entre tamanho e colo do aneurisma, múltiplos aneurismas, AVCI antigo, etnias como a japonesa, finlandesa e hispânica. Doenças que também podem estar presentes são as do tecido conectivo, representado pelas síndromes de Ehlers-Danlos e Marfan e doença dos rins policísticos ⁽¹⁾.

Torque teno vírus (TTV) do latim (*Torques and Tenuis*), significa colar e fino, respectivamente, representando duas de suas características moleculares. Descoberto em 1997, é vírus agrupado na *família Circoviridae* do gênero *Anellovirus*. A infecção do TTV tem prevalência de mais de 95% na população, apresenta dissociação com idade, condição de saúde e condição socioeconômica. Esse vírus é do tipo comensal e parece não induzir uma manifestação clínica específica, porém está presente em associação com várias condições, como transfusão sanguínea, linfoma, mieloma e doenças que afetam a imunidade acabam aumentando a viremia, incluindo sepse, câncer e transplante ⁽⁴⁾.

Por outro lado, o Herpes vírus humano (HHV) pode causar diversas condições, como rinites, esofagite, colite, pneumonia, infecção neonatal, infecção genital, vasculite, trombose isquêmica, aterosclerose, câncer, doença inflamatória, arterite de grandes células e granulomatose de aorta. Um exemplo de HHV é o Epstein-Barr vírus (EBV) que, em sua forma latente, está presente em 90% da população mundial. A saliva é sua principal via de transmissão ^(5, 6).

Diversos estudos analisaram a presença de bactérias e vírus e seu potencial em predispor a infecções crônicas e desencadear processos patológicos, por meio de mecanismos inflamatórios. Estudos evidenciaram associações entre periodontite e o desenvolvimento de doenças, como aneurisma cerebral, aneurisma de aorta e AVCI, como por exemplo. Outros estudos avaliaram a relação da alteração da microbiota intestinal e o aneurisma cerebral, em testes feitos com animais. ^(5, 6).

Alguns estudos evidenciam relação da alteração da flora intestinal normal e aumento da prevalência de condições que geram dor crônica ou fibromialgia, por meio do aumento e perpetuação de inflamação crônica. Outros trabalhos associaram, por exemplo, doenças demenciais com a presença de infecção viral. Nos últimos 4 anos, essas pesquisas avançaram muito e suportam o entendimento que patógenos podem levar a processos inflamatórios e desencadear tanto ações locais como sistêmicas, ativando e

perpetuando a ação de citocinas e processos inflamatórios. No caso de doença aneurismática cerebral, estudada nesta tese, as atuais evidências em relação a fatores de risco clássicos não são suficientes para justificar isoladamente as alterações inflamatórias ocorridas na microvasculatura e citoarquitetura no processo de desestruturação da parede do vaso, podendo desencadear a formação e ruptura de AI. Esta lacuna do conhecimento motivou o atual estudo a pesquisar uma relação entre infecção viral na parede vascular arterial e o AI ⁽⁷⁻¹⁸⁾.

Inflamação crônica pode enfraquecer a parede arterial e, conseqüentemente, formar um AI, bem como colaborar com sua ruptura. Esta hipótese é devido ao processo que decorre da inflamação da artéria, acompanhada de alterações em suas camadas, como por exemplo, apoptose, infiltração de células T, macrófagos, ativação de complemento, modificação das *tight junctions*, interleucinas IL1, IL17, TNF β e interferon. Essa condição, em conjunto com os conhecidos fatores de risco, pode estar presente na formação do aneurisma cerebral. Pyysalo et al.⁽¹⁴⁾ estudaram a presença de bactérias periodontais na parede de AI, incluindo o grupo *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Streptococcus sp.*, *Str. mitis*, *Porphyromonas gingivalis* *Fusobacterium nucleatum*. Patógenos orais e vírus já foram anteriormente estudados e detectados em outras condições, como em placas ateroscleróticas e em aneurisma de aorta abdominal, corroborando o entendimento da relação entre infecções crônicas e desenvolvimento de alterações vasculares ^(13, 14, 19-25).

O desenvolvimento de novas técnicas para analisar o genoma viral e a crescente preocupação mundial com a influência das infecções virais e o comportamento do desenvolvimento das doenças tem possibilitado sequenciar o DNA e aumentar o entendimento a respeito da influência dos patógenos na fisiopatologia de doenças vasculares. Nos estudos dos vírus, estes avanços possibilitam analisar o impacto da presença do vírus na parede do vaso.

Os mecanismos sobre formação e ruptura de AI não são totalmente conhecidos na literatura. O processo de formação de AI parece se comportar de forma diferente. Os fatores de risco conhecidos não explicam esse fenômeno em todos os casos em que a doença aneurismática se manifesta. Sabe-se, por exemplo, que, pacientes sem fatores de risco também podem desenvolver um AI. A detecção de vírus na parede de AI pode preencher essa lacuna na literatura no que diz respeito a fator de risco adicional ao processo de formação e ruptura de AI, como fator de desarranjo de suas camadas por meio de processo inflamatório.

Infecções de vírus como pan-HHV e TTV são prevalentes na população e podem promover infecções crônicas e silenciosas, inclusive nos vasos sanguíneos, causar alterações estruturais na citoarquitetura dos vasos arteriais, aumentando a fragilização, a inflamação na parede e a formação de aneurisma. A resposta e a qualidade da resposta imune do paciente podem impactar ativamente o desenvolvimento da condição.

Esta tese traz diversos estudos correlacionando a presença de bactérias no tecido vascular arterial, porém não há estudos a respeito da associação de vírus em vasos arteriais cerebrais. Estudos sobre a associação de vírus à doença intracraniana foi correlacionado, principalmente, com aterosclerose e doenças demenciais. Por outro lado, em aneurisma de aorta, já existem estudos mostrando associação tanto de bactérias quanto de vírus. Desta forma evidencia os avanços das pesquisas dos últimos anos no tocante à presença de patógenos associados à doença vascular e sua contribuição na fisiopatologia do desarranjo estrutural da parede do vaso.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

1. Avaliar a presença de DNA dos Torques teno vírus e dos Herpes vírus humanos em amostras de parede dos aneurismas intracranianos rotos e não rotos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Histórico: aneurisma intracraniano

As primeiras descrições de AI datam de 3.000 anos. Imhotep (2725 A.C), o fundador da antiga medicina egípcia provavelmente foi o autor que descreveu o tratamento de AI no papiro de *Ebers*. O físico grego Pergamon de Galino (129-210 D.C) cunhou o termo aneurisma (“aneurisma”, um alargamento; “anu”, do outro lado; “eurys”, ampla) ^(26, 27).

Em 1761, Pádua Morgagni descreveu a dilatação do ramo posterior das duas carótidas. AI roto foi primeiro descrito em 1765 por Biumi. Em 1814, Blackall publicou um relato de caso sobre HSA relacionado com ruptura aneurismática. Entretanto, John Blackall (1771-1860 D.C) foi o autor que fez conexão clínica entre HSA e ruptura aneurismática em uma descrição de um caso em 1810 ⁽²⁷⁻²⁹⁾.

A primeira descrição cirúrgica foi documentada por Victor Horsley em 1885, que descobriu acidentalmente um AI na fossa média, operando um paciente com tumor cerebral, ligando a carótida cervical com bom resultado clínico. Harvey Cushing (1869-1939) descreveu a primeira série de pacientes operados com técnicas de craniotomia, “wrapping” da artéria e clipagem temporária cervical. Em 1911, Cushing desenvolveu um clipe para controle de sangramento em cirurgias de aneurisma ⁽³⁰⁾.

Pela primeira vez, em 1937, Walter Dandy usou cliques de Cushing após pequena variação feita por McKenzie. Esta cirurgia marca o nascimento da moderna neurocirurgia vascular. Em 1957, Theodore Kurze foi o primeiro neurocirurgião a operar um aneurisma com clipe sob uso de microscopia. Até os anos 1970, existiam instrumentos precários com baixa magnificação e a neuroanestesia ainda estava em sua fase inicial de desenvolvimento. Após os anos de 1970, Yäsargil introduziu os conceitos de microscopia aplicada à neurocirurgia e difundiu até os dias de hoje ⁽³¹⁾.

Ao longo do tempo, os avanços são exemplos de bravura, engenhosidade e perseverança de pacientes e médicos. Mesmo com grandes avanços nos últimos anos, a história natural e a evolução da HSA são desfavoráveis e muitos pacientes ainda são vítimas de seus efeitos e muitas perguntas ainda precisam ser respondidas com relação à formação e ruptura de AI ⁽²⁷⁾.

3.2 Aneurismas cerebrais

Os AIs representam uma dilatação anormal na parede do vaso sanguíneo. Eles se desenvolvem, mais comumente, em áreas de bifurcação e locais com anormalidades estruturais da parede. Ao analisar as camadas de um AI, há ocorrência de fenômenos patológicos. Na camada elástica interna, ocorre uma fragmentação e afinamento, enquanto a camada média sofre um aumento desordenado de sua estrutura, aumentando seu volume, porém de forma não eficaz, gerando menor resistência ao fluxo sanguíneo. Por último, a camada mais externa, a adventícia, torna-se mais fibrótica ^(3, 32, 33).

Os aneurismas saculares representam 90% do total de aneurismas. Os outros tipos de aneurismas incluem os fusiformes (geralmente, em segmentos arteriais longos), traumáticos, micóticos, dissecantes e micro aneurismas (em pequenas perfurantes nos casos de hipertensão crônica). A circulação anterior comporta 85% dos aneurismas. Felizmente, a maioria dos aneurismas é de tamanho pequeno. Aproximadamente, 50-80% dos aneurismas não vão se romper durante a vida ^(34, 35).

Os AIs são mais prevalentes entre 35-65 anos, sua incidência aumenta a cada década com pico aos 60 anos. Observa-se uma razão entre mulheres e homens de 2:1. Aproximadamente, 10-30% dos aneurismas podem ser múltiplos. A incidência de aneurisma incidental em parentes de primeiro grau com aneurisma pode chegar a 4-9%, sendo maior quando se compara à população em geral. Os aneurismas de familiares de primeiro

grau tendem a romper em tamanho e idade menores, comparados com os de ocorrência não familiar ^(36, 37).

Os riscos para formação de aneurisma são divididos em fatores de risco modificáveis e não modificáveis. Os modificáveis são abuso de álcool, terapia hormonal (um exemplo, é estrogênio, ainda controverso) uso de drogas, como cocaína, hipertensão arterial, tabagismo, sendo os dois últimos os mais importantes. Já os não modificáveis são sexo feminino, já ter tido algum evento de HSA, condições genéticas, idade avançada, história familiar (dois familiares de primeiro grau), destacando-se os dois últimos. Por fim, os três principais fatores de risco são hipertensão, tabagismo e história familiar em ordem de importância ^(38, 39).

É necessário descartar a presença de síndromes genéticas ou condição médica que possam estar associada ao aneurisma, dentre elas, aneurisma de aorta, válvula aorta bicúspide, coarctação de aorta, síndrome de Ehlers-Danlos, displasia fibromuscular, telangiectasia hemorrágica hereditária, malformação arterial venosa intracraniana, síndrome de Klinefelter e Marfan, neurofibromatose tipo 1, síndrome de Noonan, feocromocitoma, rins policísticos, pseudoxantoma elástico, esclerose tuberosa, deficiência de alfa 1 antitripsina e alfa glucosidase, mixoma atrial e osteodisplasia. As síndromes genéticas devem ser consideradas quando mais de um membro da família de primeiro grau é afetado ^(32, 40-42).

3.3 História natural da doença

A manifestação mais comum de AI é sua ruptura com formação de HSA. Com o advento de exames de imagens mais sofisticados, é possível a detecção cada vez mais precoce dos aneurismas, antes de sua ruptura, aumentando a sensibilidade. Os aneurismas não rotos são, em sua maioria, assintomáticos ⁽⁴³⁾.

Com frequência, a HSA é associada a significativa morbimortalidade, especialmente, quando o diagnóstico não é feito em tempo adequado. Por volta de 2% todas as emergências médicas são relacionadas com dor de cabeça e 1-3% destas com HSA. Assim, 85% das HSA não traumáticas representam ruptura do aneurisma. Alguns fatores podem levar a maior risco de ruptura, como a presença de aneurismas de circulação posterior, tamanho (sobretudo quando acima de 7 mm) e histórico de tratamento anterior com colo residual presente. Em relação à frequência de ocorrência e localização, em ordem decrescente, observa-se a artéria comunicante anterior (30%), a comunicante posterior (25%), a cerebral média (20%), a bifurcação carotídea (7,5%), a topo de basilar (7%), as artérias cerebelosas anteriores posteriores (PICA 3%) e outros tipos (3,5%) ⁽⁴³⁾.

A HSA apresenta-se com uma clínica típica de cefaleia sentinela (a cefaleia caracteriza um alerta clínico, que pode ser acompanhado de HSA) ou cefaleia em trovoada, caracterizada por uma dor de cabeça intensa, sendo esta referida como a pior da vida do paciente. Outros sintomas podem estar presentes, como confusão mental, déficit motor, tontura, disartria, alterações visuais, memória, torpor e coma. Alguns sinais podem estar presentes, como a rigidez da nuca, perda de consciência, sinais de irritação meníngea, epilepsia, síncope, soluço, torpor e coma, alterações cognitivas, tontura, disartria, alterações visuais e de memória ⁽¹⁾.

3.4 Formação, crescimento, ruptura e inflamação

Nos últimos anos, os estudos avançaram no entendimento relacionado à formação, crescimento e ruptura de AI. Entretanto, a hipertensão e o tabagismo são os maiores agentes causadores de mudanças da arquitetura vascular. Os achados histológicos consistem no afinamento da íntima e um remodelamento da túnica média e enrijecimento com calcificação da adventícia. O estresse hemodinâmico potencializa esses efeitos da formação de aneurismas em ramos arteriais ⁽⁴³⁾. (Figura 1).

Figura 1 - Esquema representando os eventos da parede arterial durante o processo de desarranjo da citoarquitetura do vaso arterial no processo de formação de AI: **(A)** Eventos da íntima da túnica: ocorre deterioração da parede, hipoplasia de sua camada, mais frágil, mais fina e depósito de entrada de células inflamatórias. Quando ocorre a junção de macrófagos e lipoproteínas, formam-se células espumosas, aumentando o processo inflamatório local. **(B)** Na túnica média, ocorrem a desorganização da parede e a hiperplasia, tornando mais espessa a redução da complacência, alterações inflamatórias e deposição de lipoproteínas e células inflamatórias contribuem para o fenômeno. **(C)** Na adventícia, ocorre proliferação de colágeno, torna-se mais rígida a redução da complacência. **(D)** Esta representação mostra a diferença entre a deterioração da parede e seu estado normal no território afetado do vaso arterial cerebral. No ponto onde há fragilidade do vaso adicionada aos fatores de risco, pode ocorrer dilatação, formando o aneurisma sacular

O estresse de cisalhamento (EC) da parede é alto e pode desencadear a sinalização pró-inflamatória na célula endotelial, que recruta macrófagos por meio da proteína 1 quimioatraente (MCP1). Esse processo leva à expressão de proteases, que são responsáveis pelo rompimento da lâmina elástica do vaso e remodelação do colágeno. Ocorrem mudanças na orientação e tipo das fibras, levando a um abaulamento externo focal da parede e à formação de AIs ⁽⁴⁴⁾.

Além disso, o EC leva à disfunção e rompimento das células endoteliais, gerando um processo inflamatório, que implica migração, alteração do fenótipo e apoptose da célula muscular lisa vascular, por meio de reações bioquímicas. Esse processo leva à secreção de citocinas e fatores inflamatórios que degradam a parede vascular, favorecendo ainda mais a formação e a progressão dos aneurismas ⁽⁴⁵⁾.

A inflamação determina a formação do aneurisma e a progressão para a ruptura, portanto, a modulação desse processo pode ser clinicamente significativa. As intervenções possíveis ainda são controversas na literatura e têm o objetivo de quebrar o ciclo de inflamação no vaso e sua consequente fragilidade ⁽⁴⁶⁾.

3.5 Herpes vírus humanos (HHV)

Os HHV são vírus de DNA fita dupla, com variação de tamanho entre 120 e 260 nm. O vírion do herpes vírus é composto de quatro estruturas morfolologicamente diferentes, que constituem o núcleo, responsável por abrigar o DNA linear de fita dupla, o capsídeo icosaedro estável composto de 162 capsômeros, o tegumento proteico não estruturado e o envelope lipídico externo ⁽⁴⁷⁾.

Os herpes vírus pertencem à família *Herpesviridae*, a principal característica desta família de vírus é a capacidade de replicação no hospedeiro. As partículas virais nunca são completamente eliminadas, levando a um quadro de infecção latente ⁽⁴⁸⁾.

O Comitê Internacional de Taxonomia de vírus determinou que a família *Herpesviridae* é dividida em três subfamílias, sendo estas os alfa-herpes vírus, beta-herpes vírus e gama-herpes vírus. Os alfa-herpes vírus correspondem aos herpes simplex 1 (HSV-1), herpes simplex 2 (HSV-2) e ao vírus varicela-zoster (VZV). Os beta-herpes vírus correspondem aos herpes vírus humanos 6 (HHV-6), herpes vírus humano 7 (HHV-7) e o

citomegalovírus (CMV), e o gama-herpes vírus corresponde ao herpes vírus humano 8 (HHV-8), também conhecido como herpes vírus do sarcoma de Kaposi (KSHV) e ao vírus Epstein-Barr (EBV) ⁽⁴⁷⁾.

3.5.1 Alfa-herpes vírus

3.5.1.1 Herpes simples 1

A alta prevalência do HSV-1 na população mundial pode ser explicada pela facilidade em sua transmissão, visto que o patógeno é facilmente transmitido por via oral. Aproximadamente, 60% da população global já entraram em contato com esse patógeno. A principal e mais comum manifestação clínica causada pelos HHV são o surgimento de vesículas e febres, quadro comumente chamado de herpes labial ⁽⁴⁹⁾.

O HSV-1 infecta o hospedeiro por meio do epitélio de mucosa, pele e córneas. A entrada viral nas células-alvo ocorre por um processo de diversas etapas. Dependendo da linhagem celular, a entrada viral pode ocorrer por fusão direta do envelope viral com a membrana plasmática da célula, sendo os queratinócitos os principais alvos para a infecção viral ⁽⁵⁰⁾.

3.5.1.2 Herpes simples 2

O HSV-2 compartilha diversas semelhanças com o HSV-1, este patógeno é o maior responsável pelos casos de herpes genital e, conseqüentemente, úlceras genitais. Uma complicação diretamente associada aos casos de herpes genital são as infecções pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), visto que as ulcerações genitais facilitam a transmissão do HIV, e a alta prevalência do HSV-2 em uma população pode ser usada como indicativo para infecções pelo HIV e casos de síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Estudos apontam que, aproximadamente, 50% dos casos de herpes genital em populações de alta prevalência também apresentam sorologia positiva para HIV ⁽⁵¹⁾.

3.5.1.3 Vírus varicela-zoster (VZV)

O VZV é um herpes vírus neurotrópico. Geralmente, a infecção primária causada pelo VZV apresenta-se na infância e é chamada de varicela, que é uma doença infecciosa altamente contagiosa, autolimitada, mas podem ocorrer complicações, sobretudo, quanto maior for a idade do paciente acometido pelo vírus ⁽⁵²⁾.

Após o período de infecção primária, o VZV entra em um estado de latência, infectando os neurônios e a raiz dorsal espinhal. A imunidade mediada por células contra o VZV cai com o passar do tempo, resultando em uma reativação viral e consequente infecção secundária, comumente chamada de Herpes Zoster que, em casos mais graves, pode apresentar complicações neurológicas acometendo, particularmente, pacientes imunocomprometidos por transplante de órgãos, pacientes com AIDS e pacientes com câncer. O mecanismo pelo qual ocorre a redução da imunidade mediada por célula ainda não é bem definido. Uma complicação causada pela reativação do VZV é a vasculopatia, doença que acomete o sistema circulatório, tendo destaque as infecções das artérias ⁽⁵³⁾.

Os sinais clínicos das vasculopatias são ataques isquêmicos transitórios e AVCI. Exames de imagem, como ressonância magnética, mostram diversas lesões isquêmicas, sobretudo nas junções de substância cinza e branca. As angiografias costumam revelar estenose em grandes vasos e dilatação pós-estenose. Estudos epidemiológicos sugerem que a infecção do VZV em artérias aumenta consideravelmente a chance de AVCI ⁽⁵⁴⁾.

3.5.2 Beta-herpes vírus

3.5.2.1 Citomegalovírus (CMV)

O CMV é um dos integrantes dos beta-herpes vírus transmitidos por diversos fluídos corporais e endêmicos em praticamente todas as regiões do mundo. O CMV é capaz de produzir infecções duradouras, visto que

permanece latente e pode se reativar durante momentos em que ocorre a queda de imunidade do hospedeiro ⁽⁵⁵⁾. A maioria das infecções causadas pelo CMV é assintomática, porém em alguns casos pode haver manifestação clínica (mononucleose infecciosa). As infecções mais graves causadas pelo CMV costumam ser em pacientes imunocomprometidos, como nos transplantados ou infectados pelo HIV sem acompanhamento médico e tratamento adequado ⁽⁵⁶⁾.

O CMV é conhecido, sobretudo, por causar infecções de mãe para filho, sendo o vírus que mais causa infecções durante o desenvolvimento fetal ⁽⁵⁷⁾. Cerca de 80% da população mundial são soropositivas para o CMV, que é responsável por mais infecções congênitas do que o ZIKA vírus e por mais complicações ao feto do que outras condições, como a síndrome alcoólica fetal ⁽⁵⁸⁾.

O CMV é considerado o mais complexo e o maior dos herpes vírus. O vírus estabelece seu estado de latência, sobretudo, nas células que apresentam o marcador de membrana CD34, como nas células progenitoras hematopoiéticas ⁽⁵⁹⁾.

3.5.2.2 Herpes vírus humano-6

Em 1986, o HHV-6 foi descoberto e, após algum tempo, foram identificadas duas espécies semelhantes, o HHV-6A e HHV-6B, subfamília *betaherpesviridae* e gênero roseolovírus. Os HHV-6 possuem em comum seu comprimento de, aproximadamente, 162 kb e quase 90% de identidade nas sequências gênicas, porém são distintos em seus tropismos e em epidemiologia ⁽⁶⁾. O primeiro a ser identificado, em 1986, foi a variante A, e a variante B foi descoberta em 1988, porém não foram classificadas como vírus distintos ⁽⁶⁰⁾.

Originalmente, designado como vírus B linfotrópico humano, o vírus foi isolado em pacientes com AIDS, linfomas, linfadenopatias e outras desordens linfoproliferativas. Inicialmente acreditava-se que o HHV-6 possuía tropismo pelas células B, porém estudos posteriores definiram que o

vírus infecta e se reproduz em células T, preferencialmente, CD4. A diferenciação entre o HHV-6A e HHV-6B também foi baseada na reatividade de anticorpos, reatividade das células T e pelo padrão de restrição de bandas, bem como propriedades imunológicas ⁽⁶¹⁾.

É bem definido que ambos os HHV-6 replicam-se em linfócitos T, porém com diferenciação por meio do receptor primário utilizado para infectar a célula. O HHV-6A usa como receptor principal o CD46, receptor encontrado em todas as células humanas nucleadas. Estudos mais recentes indicam que o principal receptor para o HHV-6B é o CD134. O HHV-6B também é capaz de utilizar o CD46 como receptor, mas isso depende da cepa viral ⁽⁶¹⁾.

O HHV-6 *in vitro* pode infectar uma grande variedade de células, como fibroblastos, célula *natural killer* (NK), hepatócitos, células epiteliais, endoteliais, astrócitos, oligodendrócitos, células da micróglia e linfócitos T CD8 (específico para o HHV-6A). Estudos indicam que os tecidos que o HHV-6 consegue infectar *in vivo* são ainda mais amplos do que *in vitro*, incluindo cérebro, tonsilas, glândulas salivares, rins, fígado e linfonodos. O sítio preferencial de latência são os monócitos, macrófagos e células do sistema nervoso central. A principal forma de transmissão é por meio da saliva, visto que altas cargas virais já foram encontradas nas glândulas salivares ⁽⁶¹⁾.

A infecção primária causada pelo HHV-6 é conhecida como roséola ou *exantema subitum*. Sintomas respiratórios podem estar associados. Esta doença caracteriza-se por um quadro febril que ocorre entre 2 e 5 dias e pela presença de algumas erupções de cor rosa que surgem no tronco e propagam-se pelo corpo ⁽⁶²⁾.

Após entrarem em estado de latência, o HHV-6A e 6B podem permanecer no cérebro e, se reativados, induzir a complicações no sistema nervoso central (SNC) como, por exemplo, o quadro de encefalite ⁽⁶³⁾. A apresentação clínica de encefalite é caracterizada pela alteração do estado mental, confusão, convulsões, desorientação e amnésia ⁽⁶⁴⁻⁶⁶⁾.

3.5.2.3 Herpes vírus humano-7

O HHV-7 é um dos integrantes dos roseolovírus, assim como o HHV-6, sendo responsável por causar *exantema subitum* em crianças, porém é reconhecido que ele não seja o principal causador dessa doença ⁽⁶⁷⁾.

Embora seja um vírus consideravelmente prevalente na população geral, não é tão patogênico como o HHV-6, visto que não possui tropismo por tantas células como o HHV-6 ⁽⁶⁸⁾.

3.5.3 Gama-herpes vírus

3.5.3.1 Vírus Epstein-Barr

O EBV foi descoberto em 1964 em biópsias de linfoma em pacientes vindos da África subsaariana ⁽⁶⁹⁾. O EBV está associado ao sarcoma de Kaposi (KSHV) que são patógenos humanos da família dos gamma-herpes vírus. As infecções causadas pelos gamma-herpes vírus costumam ser assintomáticas em pacientes imunocompetentes; porém, em pacientes imunocomprometidos, ambos os vírus são relacionados com o surgimento de diversas malignidades, como linfoma de célula B de Hodgkins, Burkitts, carcinoma de nasofaringe e o sarcoma de Kaposi ⁽⁷⁰⁾.

O EBV infecta quase 95% de toda a população mundial. Esse vírus costuma ficar latente na região da orofaringe durante a vida. A infecção pelo EBV em adolescentes e jovens costuma resultar em uma doença chamada mononucleose infecciosa, caracterizada por dor de garganta, febre, linfadenopatia e esplenomegalia ⁽⁷⁰⁾. Antes de apresentar o quadro de mononucleose, o vírus passa por um período de incubação de quase 6 semanas ⁽⁷¹⁾.

3.5.3.2 Herpes vírus humano-8

O HHV-8 é associado com doenças hematológicas, bem como tumores sólidos. Diferente dos outros herpes vírus, o HHV-8 possui baixa

prevalência na população geral, sendo prevalente em algumas regiões do globo. O HHV-8 é reconhecido pelo tropismo por linfócitos B ⁽⁷²⁾.

Populações residentes na África subsaariana e na região da bacia amazônica são consideradas populações de alta prevalência, sendo encontrado em, aproximadamente, 50% dessas populações. A população do mediterrâneo é considerada de média incidência, quase 20% dos indivíduos. O grupo de baixa incidência corresponde aos Estados Unidos da América e Europa, onde o vírus é encontrado em menos de 5% ⁽⁷²⁾.

Pela primeira vez, o HHV-8 foi identificado, em 1993, em um paciente que apresentava sarcoma de Kaposi. Este vírus passou a ser identificado com mais frequência em áreas endêmicas. Com o advento de HIV e a expansão dos casos de AIDS, o sarcoma de Kaposi passou a ser mais frequente na população, bem como a identificação de HHV-8 ⁽⁷²⁾.

Em 1972 o sarcoma de Kaposi foi descrito pela primeira vez por Moritz Kaposi, quando ele identificou sarcomas multifocais pigmentados na pele de homens de idade avançada. A causa do surgimento desses sarcomas era desconhecida até 1993, quando o HHV-8 foi identificado como o provável causador dessa doença, também associada com quadros de imunodeficiência, como por exemplo, em pacientes diagnosticados com AIDS ⁽⁷³⁾.

3.5.4 Influência dos HHVs no sistema nervoso central

As infecções por vírus EBV estão relacionadas à ocorrência de outras doenças cerebrais e vasculares. A proteína latente EBV EBNA1 e a proteína lítica precoce BZLF1 foram encontradas em astrócitos e micróglia, além de linfócitos B em 82% dos casos de esclerose múltipla (EM) em estado ativo de transcrição, indicando uma possível correlação com os processos de inflamação e degeneração do tecido neural ⁽⁷⁴⁾.

Uma complicação rara é a encefalopatia, condição causada pela imunotoxicidade da infecção por EBV e, geralmente, restrita a crianças e

pacientes imunocomprometidos, mas, que pode afetar pacientes adultos imunocompetentes ⁽⁷⁵⁾.

Relatos de casos também indicam a ocorrência de mielite transversa aguda e a combinação de polirradiculite e síndrome do corno anterior em pacientes imunocompetentes, relatando o possível desenvolvimento de sequelas neurológicas ⁽⁵⁾.

As infecções crônicas ativas podem envolver uma ampla variedade de manifestações. O envolvimento de meninges cerebrais, parênquima, sistema vascular, epitélio e tecido linfoide vêm sendo relatados como causa de distúrbios neurológicos, como dilatação de aneurismas fusiformes, meningite, meningoencefalite e encefalomielite disseminada. No sistema nervoso central, as consequências vasculares devem-se à invasão direta do vírus, à infiltração de linfócitos infectados pelo EBV e à deposição de complexos antígeno-anticorpos no endotélio.

Uma das principais causas de morbidade nas doenças cardiovasculares e cerebrovasculares é a aterosclerose. A etiopatogenia das placas de ateroma é semelhante ao processo inflamatório crônico, sendo possível estabelecer associação com infecções virais. Alguns estudos vêm demonstrando alta prevalência de EBV, assim como de CMV e TTV, em placas de ateroma, apoiando a hipótese de etiologia viral, sobretudo, em pacientes com doenças vasculares ^(76, 77).

O AVCI e o acidente vascular cerebral hemorrágico (AVCH) podem ser causados por HHV. A ruptura dos vasos dentro de uma lesão do lobo temporal causado por HSV-1 é o mecanismo presumido de hemorragia, que pode ter um resultado potencialmente fatal. A isquemia cerebral está sobretudo relacionada à vasculite cerebral multifocal de grandes vasos associados ao HSV-2, em que o desfecho é mais favorável ⁽⁷⁸⁾.

A infecção por HSV-1 e HSV-2 pode aumentar o risco de desenvolver aterosclerose. Contudo, o nível de anticorpos específicos para CMV e EBV é elevado em pacientes com doença vascular e a presença de IgG específica para CMV está associada ao desenvolvimento da doença ⁽⁷⁹⁻⁸²⁾.

3.5.5 Infecção por CMV e outros tipos de aneurismas

Microrganismos como *Treponema Palidum*, *Chlamydia Pneumoniae* e CMV estão envolvidos na patogênese do aneurisma de aorta ⁽⁸³⁾.

Evidências cada vez maiores mostram que o CMV está associado ao desenvolvimento de aterosclerose, reestenose após angioplastia coronária em pacientes com rejeição crônica e aumento da incidência de infarto do miocárdio em transplantados ⁽⁸⁴⁻⁸⁶⁾.

No tecido, o CMV primeiro infecta fibroblastos e células endoteliais, mas o ácido nucleico do CMV é identificado nas placas ateromatosas da aorta abdominal. Em particular, o DNA do CMV faz uma reação imuno mediada de antígenos precoces, presentes nas diferentes camadas da aorta, predominante na aterosclerose ⁽⁸⁶⁾.

3.6 Torque teno vírus

O Torque teno vírus (TTV), que foi originalmente descoberto em 1997, revelou-se uma nova família de vírus ^(87, 88). Atualmente, a classificação do TTV está dentro da família *Circoviridae*, gênero *Anellovirus*, sendo o primeiro vírus descoberto desta família a infectar humanos ⁽⁸⁹⁾.

3.6.1 Vias de transmissão

A transmissão de TTV pode ocorrer de diversas formas, podendo, por exemplo, replicar no fígado, sendo eliminado pelas fezes ^(90, 91).

A via de disseminação sexual pode ser possível baseada em estudos que observaram DNA de TTV no sêmen ⁽⁹²⁾ e em colo uterino de indivíduos infectados ^(93, 94). Existe ainda uma relação entre a presença de TTV e o número de parceiros sexuais.

Outra via de transmissão é a vertical. Um estudo realizado por Simmonds et al. (1998) ⁽⁹⁰⁾ não demonstrou a existência de transmissão intrauterina de TTV. Em 2000, Morrica et al. ⁽⁹⁵⁾ testaram o sangue do cordão umbilical de 15 mulheres italianas positivas para TTV, em 12 observaram o vírus, sugerindo transmissão uterina ⁽⁹⁶⁾. Por outro lado, a investigação da presença do vírus no leite materno sugeriu uma possível transmissão pós-natal ^(95, 96).

A hipótese de transmissão do vírus por via aérea, a depender da carga viral, em *swabs* de secreção nasal de crianças aumenta a hipótese de que o vírus possa se espalhar facilmente ⁽⁹⁷⁾. Leary et al. (1999) ⁽⁹⁸⁾ observaram a presença do vírus em animais de consumo humano: infecção em 30% de ovinos, 25% de bovinos, 20% de suínos e 19% de frangos.

3.6.2 Distribuição geográfica

O TTV tem distribuição global. A soro-prevalência elevada (60-98%) de TTV vem sendo demonstrada em pessoas que aparentam ser saudáveis em várias localidades em todo mundo. Existe variabilidade genética em diferentes regiões, mas alguns genótipos são comuns, mesmo em grupos que se apresentam isolados, como é o caso de alguns grupos que habitam a floresta equatorial de Papua Nova Guiné, Oceania ⁽⁹⁹⁾.

No Brasil, a infecção pelo vírus parece estar presente em diversos grupos, mesmo em indivíduos sem história de transfusão sanguínea ⁽¹⁰⁰⁾. Em um estudo na região Sul do País com 130 pessoas (91 adultos e 39 crianças com idade entre 0 e 10 anos), encontrou-se presente o vírus em 73% entre as crianças e 44% entre os adultos ⁽¹⁰¹⁾.

3.6.3 Potencial patogênico

A relação entre a presença de TTV e doença hepática ainda é controversa ⁽¹⁰²⁾. Christensen et al. (2000) ⁽¹⁰³⁾, em seu estudo com 185 pacientes infectados pelo HIV-1, sugeriram que este vírus poderia facilitar

a replicação de TTV em vigência de imunodeficiência, de modo indireto pelo seu efeito imunodepressor. Entretanto, os autores observaram que a presença de TTV era um fator que pode ser associado à piora do prognóstico dos pacientes infectados pelo HIV-1, independente de qualquer outro fator relacionado com o agravamento do quadro clínico dessa população específica ⁽¹⁰³⁾.

Além disso, Diniz-Mendes et al. (2004) ⁽¹⁰⁴⁾ observaram que o DNA de TTV vem sendo detectado em grupos de pacientes infectados pelo HIV com alta carga viral comparativamente aos pacientes do grupo controle. Os autores propuseram que os níveis de TTV poderiam influenciar em um decréscimo da imunidade do paciente hospedeiro. Além do mais, a infecção com diferentes genótipos de TTV está muito mais frequente em pacientes com HIV do que nos controles ⁽¹⁰⁴⁾. O vírus TTV pode ser um fator desencadeante para doenças autoimunes, entre elas, o lúpus eritematoso sistêmico ⁽¹⁰⁵⁻¹¹⁰⁾.

Entretanto, existem evidências em que a viremia de TTV está inversamente relacionada à porcentagem de linfócitos T. Em pacientes com linfoma e mieloma, a diminuição das células CD8+, após a quimioterapia, foi concomitante ao aumento dos níveis de TTV. Por outro lado, os pacientes com redução de células CD4+ demonstraram viremia de TTV significativamente elevada ⁽¹¹¹⁾.

Outras condições médicas que afetam a resposta do sistema imunológico também estão associadas a picos de viremia por TTV, incluindo sepse, câncer sólido não tratado e transplante de células-tronco e órgãos sólidos ⁽¹¹²⁾.

A infecção pelo TTV induz viremia duradoura e, consequentemente, o vírus pode ser identificado em diversos órgãos; como fígado, pulmão, medula óssea, baço e outros tecidos linfoides. O diagnóstico é feito com a detecção de DNA viral em plasma ou outras amostras clínicas. Assim, o nível sérico de TTV varia, visto que ocorre um desequilíbrio entre a resposta

imune e a replicação viral, e esta variação pode determinar a patogenicidade viral ⁽¹¹²⁾.

A alta prevalência e a infecção crônica sugerem que o TTV pode estabelecer uma interação bem-sucedida com o organismo hospedeiro, evitando a resposta imune. É proposto que o genoma de TTV seja usado para alvejar transcritos da célula hospedeira, incluindo um cofator denominado NMI, resultando na inibição da sinalização do interferon e consequente prejuízo da resposta antiviral do hospedeiro. Provavelmente, esse mecanismo não seja o único, nem mesmo o mais importante, portanto, novos estudos serão fundamentais para esclarecer as interações subjacentes entre o TTV e o hospedeiro ⁽¹¹³⁾.

Embora a infecção crônica não tenha nenhuma manifestação clínica clara, está potencialmente associada a doenças hepáticas e respiratórias, distúrbios hematológicos, câncer e periodontite. O TTV também está relacionado a outras doenças cardiovasculares, sendo já demonstrado seu envolvimento direto na formação de placas de ateroma em pacientes cardíacos. Seu mecanismo está associado à interferência na atividade do fator nuclear *kappa beta*, importante fator de transcrição na inflamação e imunomodulação. Também é possível que a indução da resposta Th2 durante a replicação viral esteja incluída nesse processo ^(114, 115).

Ao infectar as células do paciente, assim chamados de hospedeiro, os vírus, pela ação de proteases, podem alterar o metabolismo destas ⁽¹¹⁶⁾. Após infectar células como macrófagos e células T, do sistema imunológico, o TTV poderia alterar a apresentação e processamento de antígenos, transformando em novos epítomos que poderiam servir de desencadeantes para a autoimunidade. Analogamente, ao que ocorre com o CMV ⁽⁸¹⁾, poderiam também interferir com a expressão de moléculas de MHC classe I.

Em alguns casos específicos de TTV, há a presença de uma proteína com potencial apoptótico. Anormalidades na regulação da morte celular poderiam levar à perda de células como linfócitos regulatórios para o

controle da autoimunidade. Todavia, a produção em excesso de restos apoptóticos, associada à depuração defeituosa da genética, mediada ou induzida pelo vírus, poderia estimular células B autorreativas via receptores *toll-like* ⁽¹¹⁷⁾.

3.7 Aspectos inflamatórios na gênese da formação de AI

A inflamação é uma reação normal do tecido ao estresse mecânico ou lesão física, química ou biológica, que se manifesta no acúmulo de células inflamatórias e na resposta imunológica. Pela primeira vez, o conceito de inflamação foi sugerido nos AI por Virchow, em 1847. Outras evidências ocorreram na década de 1930, quando Maass et al. descreveram a infiltração de células redondas, provavelmente, linfocíticas, sobretudo, no colo de AI ⁽¹¹⁸⁻¹²¹⁾.

O papel das bactérias na fisiologia de várias doenças vem sendo motivo de pesquisa por diversos estudiosos. Assim, a HSA de um AI roto causa elevada mortalidade entre os pacientes em idade produtiva ⁽¹²²⁾.

A inflamação é uma reação do tecido ao estresse, lesão física, química ou biológica, que se manifesta no acúmulo de células inflamatórias e na resposta imunológica. A inflamação desempenha um papel importante como mecanismo de defesa contra patógenos invasores. Mas, em muitas doenças inflamatórias agudas e crônicas, a reação inflamatória é asséptica, não envolvendo patógenos. Além disso, a inflamação ocorre em muitas doenças, como uma reação à lesão do tecido causada por qualquer mecanismo e como parte da cicatrização de feridas e da formação de cicatrizes, que no caso estudado ocorre na parede do vaso ^(118, 119).

Outras evidências são da década de 1930, quando Mass (1937) e (1961) descreveu a infiltração de células redondas, provavelmente, linfocíticas, em especial, no colo de AI. Estudos posteriores mostraram a presença de infiltrações de células inflamatórias e mediadores inflamatórios

na parede de AI, sua associação com o enfraquecimento crítico da parede de AI e a ruptura da parede e, finalmente, sua associação com o enfraquecimento crítico da parede e ruptura da parede de AI (118, 119, 121, 122).

3.7.1 Histopatologia da degradação da parede de AI

Geralmente, a degradação da parede do AI é iniciada na bifurcação da artéria cerebral. Rupturas na lâmina elástica interna e a remodelação da parede vascular fazem parte da formação do AI que, normalmente, fornece força estrutural às paredes da artéria. Estas alterações foram detectadas, sobretudo, nas bifurcações da artéria cerebral de pacientes com AI, mas também ocasionalmente em bifurcações em indivíduos saudáveis. Em um ambiente experimental, rupturas na lâmina elástica interna de uma artéria normal, bem como a formação de AI são alterações que podem ser induzidas pela alteração da hemodinâmica de cisalhamento por meio da elevação pressórica (121, 123-125).

As alterações histológicas estão associadas à suscetibilidade de AI à ruptura. Frösen et al. (2004) evidenciaram que AI de paredes arteriais com aparência normal tinham menor risco de ruptura. Por outro lado, um risco de ruptura gradualmente crescente nas paredes mais espessas com hiperplasia miointimal, trombo ocasional nas paredes trombosadas mais espessas, número reduzido de células murais e em paredes hipocelulares finas com trombos organizados. A importância da qualidade da estrutura da parede de AI para avaliar sua vulnerabilidade, a ruptura, em conjunto com o estudo dos agentes, pode colaborar no entendimento do desarranjo da citoarquitetura do vaso (126).

Células da muscular lisa desencadeiam um processo de remodelamento constante e proliferação desorganizada, ativando proteínas quinases ativadas por mitogênio (MAPks) e um depósito de tecido fibroso na adventícia. São fenômenos que ocorrem no vaso e que desencadeiam um processo de remodelamento constante, indicado pela desorganização das estruturas da parede e sua fragilidade arquitetural (125-128).

3.7.2 Degeneração da parede de AI

Uma parte do processo degenerativo da parede do AI é o desaparecimento de células, especialmente em razão da morte celular da camada de músculo liso. A matriz extracelular (MEC), sintetizada sobretudo pela camada de músculo liso (e, possivelmente por miofibroblastos), mantém a resistência estrutural da parede. Na parede normal da artéria cerebral, a camada de músculo liso é, sobretudo, do tipo contrátil, permitindo a regulação precisa do fluxo sanguíneo. No entanto no AI, o músculo liso sofre perda de células que sintetizam a matriz, levando um período mais longo para contrair uma diminuição na síntese e na renovação da MEC e, portanto, uma fraqueza estrutural da parede de AI ⁽¹²⁹⁻¹³¹⁾.

Tanto a apoptose como a necrose, dois tipos de morte celular, foram detectadas na parede de AI. Na apoptose, as células morrem de forma pré-programada em resposta à sinalização de morte, resultando em um efeito pró-inflamatório. Em contraste, a morte celular necrótica em resposta a uma lesão aguda leva a uma explosão de conteúdo celular altamente pró-inflamatório. Por outro lado o mecanismo para formação dos aneurismas fusiformes é um pouco diferente, dar-se pela lesão da vasa vasorum ^(132, 133).

3.7.3 Inflamação da parede de AI e infiltração de células inflamatórias

A maioria dos AIs (83–84%) rompe-se no domus e o restante na parte proximal; apenas 2% das rupturas ocorrem na região cervical. Curiosamente, infiltrações de células inflamatórias foram detectadas em AIs não rotos em áreas semelhantes dos aneurismas rotos nas mesmas proporções. Em uma série de autópsias de 79 AIs não rotos, 29% apresentavam leucócitos polimorfos nucleares e outras células inflamatórias. Na maioria dos casos (78%), as infiltrações celulares ocorreram no fundo e sempre foram acompanhadas de fibrose. Mais importante, a fibrose nunca existiu sem uma infiltração de células inflamatórias, sugerindo que seja secundária à inflamação. Além disso, em uma série de autópsias de 289 AIs rotos, à margem do local da ruptura sempre existia fibrina ^(134, 135).

A fibrose é considerada a fase final das reações inflamatórias crônicas. Crompton et al. identificaram as células inflamatórias vistas abaixo do endotélio e profundamente na parede de AI, como leucócitos polimorfos nucleares, células plasmáticas, além dos leucócitos polimorfos nucleares. As análises imuno-histoquímicas verificaram que as células inflamatórias nas paredes de AI eram sobretudo macrófagos e linfócitos T (células T), algumas células NK e alguns linfócitos B (células B) ^(135, 136).

Um aumento nas infiltrações de macrófagos, células T e leucócitos na parede do AI está associada à ruptura, mas o gatilho inicial para a inflamação de AI ainda é desconhecido. Modelos experimentais de AI induzidos por hipertensão em roedores e caninos implicam que a infiltração de células inflamatórias não é, necessariamente, a etapa primária na formação de AI, mas se manifesta na pré-formação de AI em uma fase posterior, por forças de cisalhamento da parede. Nos estudos de AI experimentais em roedores, a infiltração de macrófagos segue a formação de AI e a disfunção endotelial, como uma resposta à quimiotaxia da parede do AI. Como em AI em humanos não podemos realizar uma análise semelhante, o momento da infiltração das células inflamatórias no progresso da formação de AI em humanos é desconhecido ⁽¹³⁷⁻¹³⁹⁾.

3.7.4 O papel do endotélio e sua hemodinâmica no desencadeamento da reação inflamatória

O dano endotelial é uma das primeiras alterações de AIs em estudos experimentais, onde o AI é induzido por hipertensão em roedores ⁽¹³⁹⁻¹⁴⁶⁾. A pressão e o cisalhamento do sangue circulante são fundamentais para a função normal das células endoteliais. Como o fluxo altera-se durante a progressão do AI, a hemodinâmica do endotélio também se altera, provavelmente, sustentando a sinalização molecular das vias pró-inflamatórias e proliferativas. Como um sinal provável de disfunção, as células do endotélio de AI em humanos expressam uma proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1), altamente quimiotática para células

inflamatórias, macrófagos, células T, células NK e basófilos, e a molécula-1 de adesão de células vasculares (VCAM-1), auxiliando no recrutamento de leucócitos. Sua indução surge, provavelmente, pela ativação do fator de transcrição nuclear fator kappa B (NF κ B), como visto em roedores na fase inicial de AI, induzido experimentalmente. O NF κ B também é altamente ativado na camada da íntima e, envolvido nas respostas celulares ao estresse, às citocinas, aos radicais livres e à lipoproteína de baixa densidade modificada de forma oxidativa, desempenha um papel fundamental na regulação das respostas imunológicas. Em estudos de AI induzidos experimentalmente em roedores, a MCP-1 foi expressa no endotélio e acompanhada por infiltração de macrófagos na parede de AI. As lesões ateroscleróticas aumentaram a expressão endotelial de MCP-1. Curiosamente, a MCP-1, com outras quimosinas, citocinas e fatores de crescimento, são importantes reguladores da fibrose⁽¹³⁹⁻¹⁴⁶⁾.

O sistema complemento é uma cascata bioquímica e pertence ao sistema imunológico inato, porque se torna ativado em resposta ao reconhecimento de padrões e não é adaptável. Os marcadores de ativação do complemento vêm sendo evidentes de forma consistente nos AIs, tanto nos casos rotos como nos não rotos. Curiosamente, a extensão da ativação do complemento também se correlaciona com a degeneração da parede de AI e o estado de ruptura, indicando o papel da ativação do complemento no aumento da inflamação na parede arterial de AI. Os produtos de ativação do complemento, C3a e C5a, são quimiotáticos às células inflamatórias e induzem a ativação e degranulação de células endoteliais, mastócitos e macrófagos, induzindo indiretamente a contração da camada de músculo liso e a permeabilidade capilar. A ativação do complemento também pode induzir o processo de morte celular por apoptose. A ativação do complemento em AIs ocorre por meio de uma via clássica baseada apenas no reconhecimento de padrões⁽¹⁴⁷⁾.

3.7.5 Modulação de AI e sua relação com a inflamação

Alterações ateroscleróticas desenvolvem-se na parede arterial como uma reação ao estresse mecânico e químico. Na aterosclerose das artérias periféricas, tradicionalmente acontece um acúmulo inicial de lipídios, que são acompanhados por hiperplasia miointimal, ativação do complemento, infiltração de células inflamatórias e, em última instância, acúmulo local de colesterol e lipídios na parede arterial. Esta placa aterosclerótica madura pode ser calcificada. Acredita-se que a resposta inflamatória seja iniciada pelo acúmulo na íntima de LDL, posteriormente, por enzimas pró-inflamatórias e radicais de oxigênio. No entanto, esse acúmulo de lipídios deve ser considerado, como um estado preliminar pró-inflamatório na formação de AI ⁽¹⁴⁸⁻¹⁵⁰⁾. Aterosclerose pode contribuir, nesse contexto, no aumento da inflamação do vaso, adicionado aos fatores que podem alterar a citoarquitetura, ativando ainda mais mediadores inflamatórios.

Em relação aos fatores de crescimento, eles podem contribuir para a remodelação, são derivados de plaquetas, fator de crescimento de fibroblastos básicos (bFGF) e fatores de crescimento transformadores α (TGF- α) e β (TGF- β) e são expressos em AIs. Os fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF) que atuam na angiogênese, vasodilatação e quimiotaxia das células inflamatórias também são expressas. Além disso, os AIs também expressam receptores ao fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), que promove a proliferação celular, com base na expressão de fatores de crescimento e receptores de fator de crescimento em AIs ⁽¹⁵¹⁻¹⁵³⁾.

IgG também é um ativador potente do sistema complemento, e é detectável em AI. A IgG é produzida, sobretudo, por imunização prévia para um antígeno específico e ativação da imunidade adquirida. O desencadeamento da resposta imune adquirida e a produção de anticorpos da classe IgG direcionados contra antígenos específicos requerem a expressão prévia do antígeno para uma célula T adjacente. Dependendo da origem do antígeno, é expressa em uma proteína de superfície do complexo

principal de histocompatibilidade de classe I ou II (MHC-I ou MHC-II). Linfócitos T vêm sendo regularmente detectados em estudos imuno-histoquímicos da parede AI e estão associados à ruptura ⁽¹⁵⁴⁾.

A função das células T depende de seu fenótipo citotóxico das células T CD8-positivas (células T) que secretam as citocinas pró-inflamatórias interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). As ações das células T auxiliares CD4-positivas (células Th) dependem de sua diferenciação, tanto no Th1 ou Th2, direcionadas pela presença de interleucina IL-12 ou IL-4. Th 1 e Th2 diferem no perfil de citocinas que produzem as células Th1 que produzem sobretudo IFN- γ , TNF- α , TNF- β e IL-18, que ativam os macrófagos e as células NK, enquanto Th2 produz, em especial, anti-inflamatórios IL-4, IL-5 e IL-10, que induzem o crescimento celular e os efeitos anti-inflamatórios. A ativação e a polarização da resposta imune adaptativa das células e macrófagos ativados inibem a proliferação da musculatura lisa e a produção de colágeno e, com IL-1 β e TNF- α , induzem a expressão de vários tipos de moléculas de adesão leucocitária. No nível transcricional, os receptores para IFN- γ são regulados positivamente nas paredes de AI ^(143, 144).

Como as citocinas do Th1 inibem a resposta do Th2 e vice-versa, o equilíbrio entre Th1 e Th2 teria um efeito substancial sobre a formação de AI. As células NK diferem das células T, pois produzem citocinas em resposta ao antígeno apresentado na molécula CD1. As principais citocinas produzidas pelas células NK são IL-4 e IFN- γ e, assim, uma célula NK pode prosseguir efetivamente no direcionamento da resposta da célula T em qualquer direção Th1 ou Th2. A mudança de direção da resposta das células T de um Th1 para Th2 pode induzir a progressão da dilatação aneurismática de um aneurisma de aorta ⁽¹⁵⁴⁻¹⁵⁶⁾.

A presença de um trombo em organização está associada à ruptura de AI. A inflamação crônica parece ter múltiplas funções na parede de AI, favorecendo, tanto a degeneração da parede de AI, como os mecanismos reparadores. A combinação de dados de estudos experimentais de AI em

animais e estudos de AIs em humanos revela que um AI parece se formar e crescer em resposta ao estresse hemodinâmico em um meio pró-inflamatório que recruta células inflamatórias, exacerbado pela disfunção endotelial, provavelmente, como um mecanismo compensatório para a formação de AI. A modulação das estruturas da parede de AI também pode levar à formação de novos imunógenos que desencadeiem ainda mais a inflamação. Além disso, alguns AIs tornam-se trombosados, o que amplifica ainda mais a reação inflamatória em curso e a degeneração da parede. Com o efeito líquido da morte celular e a diminuição da renovação da matriz, a parede de AI degenera-se gradualmente, perde sua resistência à tração e, por fim, rompe-se ^(157, 158).

Tanto os eritrócitos como as plaquetas ficam presos na rede de fibrina do trombo fresco, e a quimiotaxia e a expressão da molécula de adesão auxiliam na infiltração de neutrófilos e macrófagos no local da lesão. Os eritrócitos começam a liberar componentes intracelulares que induzem o estresse oxidativo e ativam o complemento. Para promover a fibrinólise e a deformação do trombo, plaquetas e neutrófilos secretam catepsina G e elastase. As enzimas proteolíticas liberadas por neutrófilos e macrófagos, provavelmente, estão envolvidas na degradação posterior da parede de AI. Posteriormente, as células inflamatórias podem migrar para a parede de AI ⁽¹⁵⁹⁻¹⁶²⁾.

Apesar de todas as pesquisas sobre AIs, a patobiologia por trás da formação e os mecanismos exatos de formação e ruptura permanecem desconhecidos. Todas as evidências dos estudos apontam para o importante papel da inflamação na formação de AI. Os estudos em amostras humanas têm, no entanto, sido limitados na localização das alterações histopatológicas comparados com parâmetros clínicos e o estado de ruptura. O único conhecimento dos fenômenos relacionados à formação de AI vem de estudos experimentais em animais.

3.8 Envolvimento de microrganismos na formação de AI

Os estudos preliminares realizados por Pyysalo et al.⁽¹³⁾ foram a grande motivação para esta pesquisa, um dos pioneiros em estabelecer a relação entre infecção periodontal e AIs. No estudo, os autores descreveram doenças periodontais causadas por bactérias. Anteriormente, já havia descrições de infecções bacterianas, como endocardite e periodontite, participando da gênese na formação de aneurisma da aorta ⁽¹³⁾.

Nos últimos 4 anos, o grupo Pyysalo et al. ^(12, 13, 14, 22) ampliou seus números de publicações, entendimento e número de população estudada, descrevendo uma série de trabalhos sobre a doença periodontal e sua relação com AI. Em 2019, Shikata et al. ⁽¹¹⁾ evidenciaram uma relação forte entre alterações da flora bacteriana intestinal com desenvolvimento de aneurismas em teste com animais. Os dados do Quadro 1 evidenciam os principais estudos referentes ao tema.

É importante ressaltar que se trata de um tópico diferente do conceito de aneurismas micóticos, estes são desenvolvidos a partir de infecções agudas e, muitas vezes, o tratamento da infecção ocorre em sua resolução espontânea; em poucos casos, há necessidade de procedimento cirúrgico ⁽¹⁶³⁾.

Infecção crônica em sítios que predispõem infecção silenciosa na qual a paciente não manifesta sintomas clínicos claros, mas, que a infecção do patógeno pode desencadear fenômenos inflamatórios é o ponto de discussão. Os trabalhos apresentados foram correlacionados a esse fenômeno com bactérias.

Com relação à análise de vírus, na literatura não há nenhum registro de um estudo que analise a presença do patógeno em amostras de aneurismas, como foi feito por bactérias anteriormente. Portanto, este estudo é inédito no tocante à análise de vírus em aneurismas, particularmente, em AIs. Há estudos que avaliam a presença do vírus em relação a outras doenças neurológicas como demências, AVCI, doença

arterial aterosclerótica, como por exemplo, mas até o momento nenhum estudo foi realizado com o fim específico de estudar a presença de DNA viral na parede de AI ⁽⁷⁻²⁴⁾.

Quadro 1 - Revisão dos principais estudos que relacionam a presença de microrganismos e AI

Autores	Doença estudada	Patógeno	DNA detectado/ total de amostra	Resultados
Pyysalo et al. 2013 ⁽¹³⁾	Periodontite	Aggregatibacter, Fusobacterium nucleatum e Treponema denticola, Actinomyces comitans.	21/36	Primeiro estudo evidenciando infecção dentária pode fazer parte da fisiopatologia na doença de AI
Pyysalo et al. 2016 ⁽¹⁴⁾	Periodontite e endodontite	Endodontite (Streptococcus sp., e o grupo Str. Mitis, Str. mitis, Str. oralis, Str. sanguis & Str. gorgonii e o grupo Streptococcus anginosus, Staphylococcus aureus e Staphylococcus epidermidis). As bactérias periodontais (Porphyromonas gingivalis, Aggregatibacter, actinomyces comitans, Fusobacterium nucleatum, Prevotella intermedia, Dialister pneumosintes, Parvimonas micra and Treponema denticola	49/70	O DNA bacteriano foi detectado em 70% nas amostras de AI.
Pyysalo et al. 2018 ⁽¹²⁾	Periodontite	Streptococcus sp., Str. mitis, Prevotella intermedia, Fusobacterium nucleatum, Aggregatibacter actinomyces comitans, Porphyromonas gingivalis	60/89	Estudo transversal em que não se pode afirmar causa e efeito, porém sugere que pode haver uma associação entre infecções dentais crônicas, especialmente, periodontite e AI.
Aboukais et al 2019 ⁽¹⁹⁾	Periodontite	Staphylococcus aureus	0/30	Ao contrário dos pacientes finlandeses, nenhuma presença bacteriana foi encontrada em AI em pacientes franceses.
Shikata et al 2019 ⁽¹¹⁾	Alteração de flora intestinal	Bactérias intestinais (ratos)	16 ratos	Microbiota intestinal contribui para a fisiopatologia dos aneurismas, modulando a inflamação. A depleção da microbiota intestinal por antibióticos reduziu a incidência quando os antibióticos foram iniciados 3 semanas antes da indução do aneurisma e continuados até o final do experimento (83% versus 6%, P <0,001).

4 MÉTODOS

4 MÉTODOS

4.1 Atendimento às normas éticas

O presente projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital das Clínicas da FMUSP, Registro CAPPesq *on line*: 15226 (20/06/2016), aprovado na plataforma Brasil número de CAAE: 61719416.6.0000.0068 (Anexo A) no dia 06/04/2017. Posteriormente, foi aprovada emenda, com número do Parecer: 4.365.165 do dia 27/10/2020 (Anexo B). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi aplicado a todos os indivíduos que aceitaram participar da pesquisa, anteriormente, ao início das coletas (Anexo C).

4.2 Processo metodológico

O estudo de prevalência foi realizado em coorte prospectiva nas seguintes fases: admissão, coleta da amostra no centro cirúrgico e por último, análise microbiológica, conforme representado na Figura 2. Os dados foram armazenados em planilhas Excel (Microsoft®) em unidades de disco móvel do pesquisador, mantendo sigilo e segurança do processo.

FMUSP: Faculdade Medicina da Universidade de São Paulo; IC: Instituto Central; IMT: Instituto de Medicina Tropical; TTV: Torque teno vírus. * Fragmento de aneurisma

Figura 2 - Processo metodológico e as fases da pesquisa

As fases foram caracterizadas do seguinte modo:

- 1) Na fase de admissão, o paciente foi categorizado entre o grupo de aneurisma roto e não roto, com base nos critérios de inclusão e exclusão;
- 2) Na fase seguinte, realizou-se a coleta no centro cirúrgico. Para a coleta, foram feitos a preparação e o treinamento de toda a equipe (Figura 3). O treinamento consistiu em ter à disposição instrumentos estéreis e o processo de conservação das amostras;
- 3) Na última fase, foi feita a análise dos casos elegíveis para a coleta no Instituto de Medicina Tropical (IMT) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) no Laboratório de Virologia (LIM-52). No laboratório, realizaram-se a conservação e a adequada extração de DNA. Sequencialmente, foi realizado PCR para detecção dos herpes vírus humanos e TTV.

Figura 3 - Figura esquemática representando a sequência do processo metodológico do estudo. **A:** Representada pelo cérebro, com a anatomia do polígono de Willis e um aneurisma de forma esquemática; **B:** Vírus patogênicos depositam-se cronicamente, levando a mudanças inflamatórias locais, modificando o microambiente do vaso e podendo migrar para outros sítios; **C, D, E, F:** Os vírus podem migrar para a corrente sanguínea, depositar nos vasos cerebrais e promover resposta inflamatória, alterando a qualidade das paredes do vaso, podendo culminar com o aumento da fragilidade das camadas e, conseqüentemente, com a formação aneurismática adicionada aos fatores de risco já conhecidos; **D:** Aneurisma cerebral não roto; **E:** Aneurisma cerebral roto. Nesse caso, ocorre rompimento arterial e extravasamento do sangue para espaço subaracnóideo. **F:** Visão anatômica da clipagem de aneurismas e o acesso mini-pterional reproduzido esquematicamente.

Figura 3 - Figura esquemática representando a sequência do processo metodológico do estudo. **G, H, I, J:** Evidencia os passos para microcirurgia cerebral. Primeiro, o planejamento do acesso craniano, posteriormente, a craniotomia com subsequente abertura dural e dissecação das cisternas cerebrais; **I:** Momento da microcirurgia em que se utilizam técnicas vasculares para a cirurgia de aneurisma cerebral, Microscópio Vario - ZEISS® e instrumental microcirúrgico para a clipagem do aneurisma cerebral; **J:** Clipagem do aneurisma; **K:** Nos casos selecionados, foi feita coleta do fragmento do Domus do aneurisma e conservada em um Eppendorf, embebido com 3 ml de soro fisiológico 0,9%, de forma estéril. Utilizou-se uma seringa para quantificar a quantidade exata de soro fisiológico; **L:** Durante a cirurgia, a conservação do material até o transporte final foi armazenada em um freezer a -20°C; **M:** O transporte do material foi realizado até o Laboratório do Instituto de Medicina Tropical, após a cirurgia e armazenado o material em -80°C; **N:** Posteriormente, foram feitas análises laboratoriais do sequenciamento do material, com amplificação de DNA viral e reação da cadeia de polimerase para vírus. Todos os integrantes da equipe foram devidamente treinados e capacitados para a coleta e conservação adequada

4.3 Característica da população

4.3.1 População do estudo

401 pacientes adultos de ambos os sexos foram admitidos na Divisão de Neurocirurgia do Hospital das Clínicas da FMUSP, entre janeiro de 2018 e novembro de 2019. Os pacientes foram divididos em dois grupos. O primeiro grupo constituiu-se de aneurismas rotos (244) e o segundo de aneurismas não rotos (177). Todavia, conforme representado nos dados da Figura 4, foram aplicados os critérios de elegibilidade, totalizando 35 coletas de fragmentos de aneurismas e, posteriormente, analisados.

Figura 4 - Seleção de pacientes estudados. Critérios de inclusão, exclusão do estudo e seleção de pacientes

4.3.2 Local do estudo

A coleta dos fragmentos de aneurismas foi realizada no Instituto Central do Hospital das Clínicas da FMUSP, as análises microbiológicas no Instituto de Medicina Tropical no laboratório de Virologia - IMT FMUSP (LIM52).

4.3.3 Critérios de inclusão

Pacientes admitidos na urgência e emergência do Instituto Central do Hospital das Clínicas da FMUSP com diagnóstico de aneurisma roto e pacientes eletivos com diagnóstico de aneurisma não roto foram elegíveis para participar do estudo. Somente foram incluídos pacientes submetidos a tratamento microcirúrgico.

4.3.4 Critérios de exclusão

Pacientes com doença aneurismática que apresentam variações anatômicas que dificultam a coleta do fragmento tecidual; complicações intraoperatórias que inviabilizam a extração do material; complexidade da anatomia e do caso cirúrgico; bem como tamanho do aneurisma, tanto aneurismas muito pequenos, como os grandes; tratamentos endovasculares. Uma última característica excludente é a opção individual do cirurgião no ato operatório e o julgamento intraoperatório de risco inerente à coleta do material, bem como ausência de armazenamento adequado no ato da coleta (falta de reservatórios de coleta no momento da cirurgia, particularmente, em cirurgias de emergência).

4.4 Processamento laboratorial microbiológico das amostras

Os herpes vírus humanos (HSV-1, HSV-2, EBV, CMV, VZV, HHV-6, HHV-7 e HHV-8), chamados de análise do pan-HHV e TTV foram analisados no laboratório de Virologia, a partir do fragmento aneurismático coletado em procedimento de microcirurgia.

4.4.1 Coleta, processamento e armazenamento

O protocolo iniciou-se com a obtenção do material biológico por meio de procedimentos cirúrgicos para retirada dos fragmentos de aneurismas realizados na Divisão de Neurocirurgia do HC-FMUSP.

As amostras de AI foram coletadas em 35 casos, 22 em aneurismas rotos e 13 em aneurismas não rotos, no centro cirúrgico do Instituto Central da FMUSP de forma estéril, e armazenados em um freezer a -20° graus temporariamente até a finalização das atividades cirúrgicas do dia, para proceder à transferência da amostra ao laboratório de Virologia - IMT FMUSP (LIM52) em conservação de -80° graus. Figura 5.

Figura 5 - Protocolo de Coleta das Amostras: **(A)** Figura referente a um caso exemplo de Microcirurgia Vascular. Esta figura mostra o aneurisma de artéria cerebral média clipado com hemostasia cirúrgica finalizada. Neste momento, o vaso do aneurisma é preparado para a coleta, respeitando os critérios de inclusão e exclusão da presente tese; **(B)** a amostra é conservada em Eppendorf estéril, com solução salina de 0,9%; **(C)** A solução salina é quantificada com 3 ml de seringa; **(D)** Temporariamente armazenado em freezer a -20 Celsius até o final das atividades cirúrgicas do dia. Após a coleta, todas as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Virologia – Lim 52 do Instituto e armazenadas a -80 °Celsius; **(E)** Estação de trabalho, **(F)** Preparação e extração do DNA em PCR viral

4.4.1.1 Biologia Molecular

4.4.1.1.1 Extração de Ácidos Nucleicos

A extração do material genético foi feita manualmente, utilizando *Qiagen DNA extraction Minikit 250* (Qiagen, Alemanha, Hilden). O processo de extração seguiu as instruções dadas pelo fabricante, que consistiu em obter DNA purificado a partir da coluna de sílica.

4.4.1.1.2 Avaliação da qualidade do DNA obtido

As amostras extraídas foram submetidas a exame de PCR com *primers* para a β -globina ⁽¹⁶⁴⁾, como controle interno da reação com o objetivo de confirmar a eficácia da extração de DNA por meio do processo de amplificação. As amostras foram analisadas por espectrofotometria para verificar a quantidade de DNA extraído. Este processo foi feito usando o espectrofotômetro *Nanodrop® 2000* (*Thermo Fischer*, Estados Unidos da América, Massachusetts). PCR é uma técnica da biologia molecular para amplificar uma única ou poucas cópias de um segmento de DNA, baseada na sistemática de replicação de DNA.

4.4.1.1.3 Amplificação de DNA viral e tipagem de Herpes vírus

Para a identificação dos oito tipos de herpes vírus humanos nos fragmentos de aneurisma foi realizada a técnica de PCR utilizando os pares de *primers* descritos por Johnson et al. (2000) ⁽¹⁶⁵⁾ e o processo de digestão enzimática para diferenciação entre os oito tipos de herpes vírus.

As sensibilidades limitantes medidas foram entre 10 e 100 cópias do genoma para HSV-1, HSV-2 e EBV e 400 cópias do genoma para CMV. Da mesma forma, a sensibilidade de PCR ensaio com o par de iniciadores VZV-P1 e VZV-P2 foi mostrada para ser entre 10 e 100 cópias do genoma para VZV entre 1 e 10 cópias do genoma para HHV-6A ⁽¹⁶⁵⁾.

Duas misturas de PCR foram preparadas, cada uma contendo *Primers* diferentes, capazes de identificar diferentes herpes vírus. O par de *primer* VZV senso e antissenso foi usado para identificar o HHV-6A e B, HHV-7 e também o VZV, e o par de *primer* HHV foi usado para identificar HSV-1, HSV-2, EBV, CMV e HHV-8. A sequência dos *primers* usados pode ser vista nos dados do Quadro 2.

Quadro 2 - Sequência dos *primers* utilizados na reação de PCR convencional para herpes vírus

<i>Primer</i>	Sequência 5'-3'
HSV PAN senso	GTGGTGGACTTTGCCAGCCTGTACCC
HSV PAN antissenso	TAAACATGGAGTCCGTGTGCGCCGTAGATGA
VZV PAN senso	GTCGTGTTTGATTTTCAAAGTTATATCC
VZV PAN antissenso	ATAAACACACAATCCGTATCACCATAAATAACCT

As misturas eram feitas em tubos de centrifugação e continham 0,5 µL de *primer* senso e antissenso já misturados, 5 U/µl de TaqPolimerase, 2,5 µl de tampão Gold Star 10X e água livre de nuclease *q.s.p* (*Thermo Fischer*, Estados Unidos da América, Massachusetts). Para a reação, as amostras foram colocadas em termociclador *Proflex PCRsystem®* (*Thermo Fisher*, Estados Unidos da América, Massachusetts). As reações para os *primers* VZV e HHV possuem ciclagens diferentes, as amostras foram incubadas em termoblocos separados. As ciclagens para cada reação podem ser vistas nos dados do Quadro 3.

Quadro 3 - Ciclos, temperatura e tempo da reação

Ciclagem	HSV PAN	VZV PAN
Desnaturação	95°C - 45 segundos 1X	95°C - 5 minutos 1X
Anelamento	94°C - 50 segundos	94°C - 50 segundos
	62°C - 50 segundos 40X	50°C - 50 segundos 45X
	72°C - 1 minuto	72°C - 50 segundos
Extensão	72°C - 10 minutos 1X	72°C - 5 minutos 1X
	4°C - ∞	4°C - ∞

Após o fim da ciclagem, foi feito um gel de agarose a 1,5%, misturando 1,5 gramas de HyAgarose (Hydragene), 100 ml de TAE 1X concentrado (*Invitrogen*, Estados Unidos da América, Califórnia) e 0,8 µl de brometo de etídio (*Invitrogen*, Estados Unidos da América, Califórnia).

As amostras que apresentavam bandas nas alturas de 500 e 600 pares de bases eram consideradas positivas e separadas para o processo de digestão enzimática. A contagem da altura dos pares de base deu-se por comparação com o padrão de massa molecular de 100 pares de base (*Invitrogen*, Estados Unidos da América, Califórnia).

4.4.1.1.4 Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição

O processo de digestão enzimático consistiu em fazer duas misturas, cada uma contendo uma enzima. As enzimas de restrição utilizadas neste processo foram BamHI e BstUI (*Thermo Fischer*, 10 U/μl). Cada herpes vírus apresentou um fragmento de banda diferente sob a ação destas enzimas. As misturas de digestão foram preparadas com tampão de digestão *FastDigest green Buffer* (*Thermo Fischer*, Estados Unidos da América, Massachusetts), enzima de restrição e H₂O destilada.

4.5 Torque teno vírus

Todas as amostras foram adequadas para avaliação da amplificação de DNA por meio de controle interno (RNaseP). A quantidade (*real-time*) de reação em cadeia da polimerase (qPCR) com indicadores específicos para TTV e uma sonda foi utilizada, como reportado anteriormente ⁽¹⁶⁴⁾.

Durante a análise, usou-se uma curva-padrão sintética com quantidades conhecidas do oligonucleotídeo sintético para quantificação de TTV- (Forward primer 5'-GTGCCGIAGGTGAGTTTA-3'; Reverse primer: 5'-AGCCCGGCCAGTCC-3'; Probe:FAM5'-TCAAGGGGCAATTCGGGCT-3'MGBNFQ; Curva sintética -5'-TTCGTAGCCCGGCCAGTCCCGTATAGCCCGAATTGCCCTTGAATGCGTTAAACTCACCAICGGCACCTGATA-3').

PCR em *Real time* foi realizado usando *Taqman Universal Master Mix* (*ThermoFisher*®), de acordo com as instruções do fabricante. Os dados foram analisados usando *QuantStudio Design & Analysis Software* v.1.4.1. A detecção limite do teste foi 1,34 log₁₀ cópias por reação [análise de sensibilidade (LOD>95%) de 21,9 cópias por reação].

4.6 Análise estatística

A estatística descritiva foi aplicada para descrever as características clínicas e demográficas dos pacientes estudados. Variáveis contínuas foram descritas como: média (desvio-padrão) ou mediana (distância interquartil), conforme apropriado à análise de normalidade dos dados. Dados categóricos foram descritos como frequências (porcentagem válida). Para comparação das médias, foi aplicado o teste T-Student ou Mann-Whitney, conforme apropriado, para variáveis contínuas; teste Qui-quadrado para variáveis dicotômicas. Adotou-se nível de significância alfa 5% bicaudal. As análises foram executadas usando-se o software *GraphPad Prism* 8.0.0 (Estados Unidos da América, San Diego).

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização

Os seguintes resultados refletem a seleção de 401 pacientes adultos de ambos os sexos, que foram divididos em dois grupos - o de aneurismas rotos (244) e o de aneurismas não rotos (177). Todavia, conforme representado, foram aplicados os critérios de elegibilidade e exclusão para a presente pesquisa, totalizando 35 coletas de fragmentos de AIs e analisado o DNA viral por meio da pesquisa de PCR alvo para TTV e pan-HHV, correspondendo 8,7% dos pacientes com aneurismas rotos e não rotos admitidos na instituição.

5.2 Vírus

5.2.1 Características da população do estudo

Dos 35 casos de aneurismas, 22 (62,8%) eram rotos e 13 (37,2%) não rotos. A variação de idade entre os grupos foi muito semelhante em relação à amostra total, o grupo de aneurismas rotos e não rotos; $57,63 \pm 1,87$; $56,8 \pm 2,41$; $58,92 \pm 3,00$, respectivamente. Em relação à distribuição entre os sexos, o sexo feminino representou a maioria da amostra estudada com 29 pacientes (82,9%), sua distribuição entre os grupos rotos e não rotos foi 18 (81,8%) e 11(18,2%), respectivamente.

A presença do vírus foi detectada em 16 (46%) das 35 amostras, dentre eles, a maior parte estava presente nos aneurismas rotos 11 (68,75%) casos e em não rotos encontrados em apenas cinco (31,25%) dos pacientes. Apenas em um caso (3%) confirmou-se presença do EBV, sendo esta amostra proveniente de um paciente do sexo feminino e do grupo de aneurisma rotos. TTV representou 15 (43%) do total de casos, sendo distribuídos 10 (62,5%) no grupo rotos e 5 (31,25%) no não rotos. Aneurismas múltiplos corresponderam a 14 (40%) da amostra, sendo representada de forma igual entre os grupos rotos e não rotos (n= 7, em cada grupo). A Tabela 1 apresenta os dados.

Tabela 1 - Resultado da análise de DNA de vírus nas amostras do estudo e distribuição entre grupos de aneurismas rotos e não rotos e a relação com aneurismas múltiplos e sua distribuição, de acordo com os grupos

	Pacientes N (%)	Aneurismas Rotos N (%)	Aneurismas não rotos N (%)
Presença de vírus	16 (46)	11 (68,75)	5 (31,25)
TTV vírus	15 (43)	10 (62,5)	5 (31,25)
EBV vírus	1 (3)	1 (6,25)	0 (0)
Múltiplos	14 (40)	7 (50)	7 (50)
Feminino	29 (82,9)	18 (81,8)	11(18,2)
Total	35 (100)	22(62,8)	13 (37,2)

TTV: Torque teno vírus; EBV: Epstein barr vírus; N: Número de pacientes

5.2.2 Análise da população em relação ao gênero

Ao analisar a população estudada, o gênero feminino representou a maior parte da amostra ($n = 29$; 82,9%), sendo 18 (81,8%) casos rotos e quatro (18,2%) não rotos. A associação entre o sexo feminino e a presença do vírus na amostra de AI foi presente em 12 casos (41,4%) e foram constatados AI múltiplos em 13 casos (44,8%). Todavia a análise do sexo masculino representou 17,1% da amostra e o vírus foi presente em quatro casos (66,6%) da amostra, foram múltiplos em um caso (16,6%) da população de pacientes que foi coletado, ou seja 35 pacientes, conforme os dados da Tabela 2. A correlação do sexo feminino, a presença de vírus e a multiplicidade não se mostrou estatisticamente significativa com teste Qui-quadrado (2.084) e $p=0,352$. Em relação aos dois sexos, proporcionalmente, o sexo feminino apresentou maior frequência de manifestação múltipla, e o sexo masculino, proporcionalmente, maior presença viral, apesar de não ser estatisticamente significativa.

Tabela 2 - Características dos pacientes categorizados por sexo, a positividade do DNA viral na parede de AI e sua relação com aneurismas múltiplos*

	Pacientes N (%)	Vírus presente N (%)	Múltiplos Aneurismas N (%)
Feminino**	29 (82,9)	12 (41,4)	13 (44,8)
Masculino	6 (17,1)	4 (66,6)	1 (16,6)
Total	35 (100)	16 (46)	14 (40)

*Qui-quadrado = 2.084; $p=0.352$; **Paciente confirmado EBV é do sexo feminino; EBV: Episten barr vírus; N: Número de pacientes

5.2.3 Caracterização das amostras de DNA viral

Nos dados da Tabela 3, evidenciam-se as análises de DNA das amostras, e os valores obtidos do CT (*cycle threshold*) e a carga viral de cada amostra e cópias de TTV por ng por DNA. Todas as amostras foram possíveis de serem lidas, e os patógenos foram identificados por meio de controle interno e da positividade de Beta globina, sendo este presente em todos os casos. Nos dados da Tabela 3, evidenciou-se que o teste foi positivo para pan-HHV apenas em um caso, que foi do subtipo EBV, representando 6,25% da amostra. Por outro lado, os vírus do grupo TTV foram presentes em 15 pacientes, representados por 93,75% de todos os vírus identificados.

Tabela 3 - Categorização dos 35 pacientes em relação à presença de DNA viral, valores obtidos do CT (*cycle threshold*) dos pan-HHV e a carga viral de cada amostra e cópias de TTV por ng por DNA

	pan-HHV (CT)/ carga viral	TTV (CT)/ Carga Viral	cópias TTV por ng DNA
1	-	-	-
2	-	37,529 / 1,1752	47,9
3	-	-	-
4	-	36,77 / 3,000	84,8
5	-	-	-
6	-	-	-
7	-	33,273 / 35,871	412,4
8	-	34,003 / 21,364	14,3
9	-	-	-
10	36,315 / 12,163*	-	-
11	-	-	-
12	-	32,481 / 62,892	1606,6
13	-	-	-
14	-	33,358 / 33,763	481
15	-	33,852/ 23,779	719,8
16	-	-	-
17	-	-	-
18	-	-	-
19	-	-	-
20	-	-	-
21	-	37,656 / 1,601	134,1
22	-	28,505 / 1055,051	91229,5
23	-	-	-
24	-	31,407 / 134,719	870,10
25	-	-	-
26	-	-	-
27	-	38,263 / 1,0404	11,9
28	-	-	-
29	-	37,179/ 2,244	29,3
30	-	-	-
31	-	35,379/ 8,048	161,7
32	-	38,315 / 1,002	9,2
33	-	32,901 / 40	481
34	-	-	-
35	-	-	-
Total de vírus 16 (46% do total da amostra)	1 (6,25%)	15 (93,75%)	

CT: *cycle threshold*; TTV: Torque teno vírus; EBV: Epstein barr vírus

*Foram analisados oito tipos de Herpes (HSV-1, HSV-2, VZV, CMV, HHV-6, HHV-7, EBV, HHV-8), sendo positivo apenas para Epstein-Barr Vírus em um caso

5.2.4 Categorização dos fatores de risco

Os dados da Tabela 4 mostram que apenas 15 dos 35 pacientes foram avaliados em relação à variável fator de risco. As exclusões foram em razão da perda de seguimento e recusa de participação do seguimento. Contudo, os fatores de risco mais associados foram em ordem decrescente: hipertensão arterial sistêmica nove casos (60%), diabetes seis (40%), tabagismo cinco (33,3%), HSA prévia duas (5,71%), história familiar três casos (20%). Os grupos de aneurismas rotos e não rotos foram homogêneos. Os dados do Gráfico 1 representam a distribuição dos subgrupos rotos e não rotos em relação às comorbidades.

Tabela 4 - Categorização dos fatores de risco da amostra estudada, dividida entre os grupos rotos e não rotos

	Pacientes	Aneurismas Rotos	Aneurismas não rotos
	N (%)	N (%)	N (%)
Hipertensão	9 (60)	4 (44,4)	5 (56,6)
Diabetes	6 (40)	1 (16,7)	5 (83,3)
História Familiar	3 (20)	2 (9,1)	1 (90,9)
HSA prévia	2 (5,71)	1 (50)	1 (50)
Tabagismo	5 (33,3)	3 (60)	2 (40)
Total	15 (100)	8 (53,4)	7 (46,6)

N: Número de pacientes; HSA: Hemorragia subaracnóidea

Gráfico 1 - Proporção de pacientes em relação às comorbidades, divididas nos grupos de AI rotos e não rotos

5.2.5 Características da localização de AI na amostra e a relação com a presença de vírus

O aneurisma mais presente na amostra foi o ACM 18 (51,4%), seguido de ACoA, pericalosa, ACI, ACoP, PICA, Oftálmica, ACA. O vírus foi mais presente em aneurismas de ACM sete (43,7%), seguido de ACoA, pericalosa, ACI, ACoP, PICA e oftálmica, mantendo a sequência das prevalências entre presença de vírus e a prevalência de AI na amostra estudada. Aneurisma da artéria cerebral anterior foi o único tipo em que não houve presença de vírus. Não houve aneurisma roto em aneurismas de pericalosa e oftálmica. No subgrupo de aneurismas ACoP, PICA e ACA, todos os pacientes manifestaram-se como aneurismas rotos. ACM representou a maioria dos aneurismas rotos 12 (54,5%) e não rotos seis (46,1%). ACM também representou maioria dos aneurismas múltiplos oito (57,1%), já os subgrupos de ACoP, e PICA não representaram nenhum caso múltiplo, conforme os dados da Tabela 5.

Tabela 5 - Características da localização de AI na amostra e a relação com a presença de vírus, nos grupos de AI rotos, não rotos e sua relação com aneurismas múltiplos

	Pacientes N (%)	Vírus + N (%)	Aneurismas Rotos N (%)	Aneurismas não rotos N (%)	Aneurisma Múltiplo N (%)
ACM	18 (51,4)	7 (43,7)	12 (54,5)	6 (46,1)	8 (57,1)
ACoA*	6 (17,1)	3 (18,7)	4 (18,1)	2 (15,3)	2 (14,2)
Pericalosa	3 (8,5)	2 (12,5)	0 (0)	3 (23)	1 (7,1)
ACI	3 (8,5)	2 (12,5)	2 (9)	1 (7,69)	1 (7,1)
ACoP	2 (5,7)	0 (0)	2 (9)	0 (0)	0 (0)
PICA	1 (2,8)	1 (6,2)	1 (4,5)	0 (0)	0 (0)
Oftálmica	1 (2,8)	1 (6,2)	0 (0)	1 (7,69)	1 (7,1)
ACA	1 (2,8)	0 (0)	1 (4,5)	0 (0)	1 (7,1)
Total	35 (100)	16 (46)	22 (62,8)	13 (37,2)	14 (40)

*Pacientes com ACoA apresentaram cinco pacientes com TTV e um com EBV. O restante das localizações é representado somente pelo TTV; N: Número de pacientes; ACM: Aneurisma da artéria cerebral média; ACoA: Aneurisma da artéria comunicante anterior; ACI: Aneurisma da artéria carótida interna; ACoP: Aneurisma da artéria comunicante posterior; PICA: Aneurisma da artéria cerebelar pôsterio inferior; ACA: Aneurisma da artéria cerebral anterior.

5.2.6 Análise da relação do vírus TTV e dos grupos de AI rotos e não rotos

A amostra selecionada evidenciou que o grupo roto foi mais presente do que o não roto, respectivamente 22 (62,8%) e 13 (37,2%) nos pacientes da amostra. Ao analisar o vírus TTV, este foi mais prevalente no subgrupo roto que no não roto, respectivamente 10 (28,6%) e 5 (14,4%). Embora haja discreta prevalência da presença viral nos casos rotos, a diferença não foi significativa estatisticamente entre os grupos, conforme evidenciado nos dados da Tabela 6. Não apresentou significância estatística ao comparar aneurismas roto e não roto e a presença do TTV, conforme expressão do Teste Qui-quadrado (X^2) = 0,786 e p = 0,732.

Tabela 6 - Frequência TTV presente em pacientes com AI rotos e não rotos

	TTV presente N (%)	TTV não presente N (%)	Total
Aneurisma roto	10 (28,6)	12 (34,2)	22 (62,8)
Aneurisma não roto	5 (14,4)	8 (22,8)	13 (37,2)
Total	15 (43)	20 (57)	35 (100,0)

TTV: Torque teno vírus; N: Número de pacientes
Teste Qui-quadrado (X^2) = 0,786 e p = 0,732

5.2.7 Associação entre ruptura de AI e a presença de vírus

A associação entre o AI roto e a presença de vírus na parede de AI não se mostrou estatisticamente significativa. Nesta análise, foram incluídos tanto os vírus TTV como pan-HHV, com os respectivos resultados; $p=0,507$, Teste Qui-quadrado (χ^2) = 0,438, Grau de liberdade (GL) = 1, como evidenciado nos dados da Tabela 7 e no Gráfico 2. A análise foi realizada incluindo tanto TTV como pan-HHV.

Tabela 7 - Análise entre a associação de AI e a presença de vírus na parede de AI

	Vírus Ausente N (%)	Vírus Presente N (%)	Total
Aneurisma não-roto	8 (22,7%)	5 (14,4%)	13 (37,1%)
Aneurisma roto	11 (32,3%)	11 (31,6%)	22 (62,9%)
Total	19 (54%)	16 (46%)	35 (100%)

N: Número de pacientes; Teste Qui-quadrado (χ^2)= 0,438 e $p = 0,507$

Gráfico 2 - Associação entre ruptura de AI e a presença de vírus

5.2.8 Associação entre aneurismas múltiplos com presença de vírus

A análise dos aneurismas múltiplos e a presença do vírus no AI não se mostraram estatisticamente significativas, conforme demonstrado no Teste Qui-quadrado (X^2) = 0,076, GL = 1, p = 0,781. A análise foi realizada incluindo tanto TTV como o pan-HHV.

Tabela 8 - Associação de aneurismas múltiplos com vírus

	Vírus ausente N (%)	Vírus presente N (%)	Total (%)
AI único	11 (31,2)	10 (28,8)	21 (60)
AI múltiplo	8 (22,8)	6 (17,2)	14 (40)
Total	19 (54)	16 (46)	35 (100)

N: Número de pacientes; Teste Qui-quadrado (X^2) = 0.0767, GL= 1, p = 0.781

Gráfico 3 - Associação entre aneurismas múltiplos e presença de vírus

5.4 Caracterização do único caso positivo para pan-HHV – caso ilustrativo

Mulher, 61 anos, tabagista (200 maços-ano), hipertensa, em uso de Losartan 50 mg duas vezes ao dia e Hidroclorotiazida 25 mg ao dia. Hospitalizada referindo cefaleia intensa, com diminuição do nível de consciência, há 4 dias, os familiares negaram episódios anteriores de cefaleia. Na avaliação inicial, apresentava PA (Pressão arterial) de 230 / 120 mmHg, escala de ECG de sete, *Hunt-Hess* três, *WFNS* de cinco e pupilas fotorreagentes isocóricas. Após a intubação orotraqueal, a avaliação neurológica apresentou pupilas fotorreagente e isocóricas e hemiparesia esquerda.

O exame radiológico revelou a presença de um aneurisma roto de 10 mm na ACoA, com irregularidades de parede, morfologia sacular, aneurismas bilaterais simétricos (em espelho) das ACMs, edema cerebral moderado com desvio da linha média de 8 mm e escala de FM 4, além de ausência de tumores cerebrais, outras doenças vasculares ou placas ateroscleróticas, conforme representado nos dados das Figuras 6 e 7.

A paciente foi submetida à microcirurgia sem complicações cirúrgicas. O procedimento foi realizado com craniotomia minipterional direita e clipagem temporária de três artérias por uma média de 3,5 minutos. A paciente desenvolveu pneumonia associada à ventilação mecânica, vasoespasmo e edema cerebral, como complicações clínicas.

No seguimento, a tomografia computadorizada de crânio revelou manutenção de desvio de linha média de 6 mm, com hérnia central sem possibilidade de evolução para extubação. Houve piora da função renal, leucocitose, aumento de PCR e pupilas anisocóricas (direita maior que a esquerda) e agravamento do quadro clínico, impossibilitando qualquer nova intervenção. A paciente faleceu no 21º dia de internação.

A análise da virologia molecular pela análise de DNA por PCR foi realizada para verificar a possível presença de um dos oito tipos de herpes

vírus no aneurisma operado roto da ACM. O procedimento foi feito, de acordo com as especificações técnicas apresentadas. O resultado positivo do direcionamento de PCR foi obtido para o vírus EBV, com carga viral de 12.163 cópias / mL no fragmento do aneurisma.

Figura 6 - Angiografia por tomografia computadorizada (AD) evidencia um aneurisma da ACoA de 10 mm de diâmetro, 2 mm de colo, irregular, morfologia sacular, com vasoespasmio angiográfico presente, representado por setas vermelhas. Asterisco em B representa ACM em aneurisma de espelho. (B-C) mostra o aneurisma da ACM a direita de 6 mm de diâmetro, 3 mm de colo, formato irregular, sacular, com vasoespasmio angiográfico. Os aneurismas estão apontados pelas setas vermelhas

Figura 7 - Reconstrução de angiotomografia computadorizada de crânio e tomografia computadorizada em uma visão axial: **(A)** reconstrução computadorizada mostra a circulação cerebral anterior com aneurismas na ACoA, ACM em seta vermelha e o asterisco representa no espelho o aneurisma ACM. **(B-C)** Imagens da tomografia computadorizada, mostram edema cerebral moderado e sangramento cerebral no parênquima e HSA, com desvio de 8 mm da linha média e escala de FM 4

Na análise de DNA, a paciente apresentou EBV positivo, sendo o único caso de pan-HHV presente, correspondendo a 3% dos casos de presença de vírus. Todavia, optou-se por descrever de forma ilustrativa as características deste único caso (Figura 8).

Figura 8 - Amostra da parede de AI evidenciando HHV: **(A)** fragmento de 500 pb visualizado em gel de 1,5%. O padrão corresponde ao HHV. C+ = controle positivo. C- = controle negativo. PM = Peso molecular. **(B)** Padrão de fragmento de banda de EBV após digestão enzimática. O primeiro fragmento foi gerado pela enzima BamHI, o segundo pela BstUI e o terceiro foi produto da amplificação por PCR

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O AI se desenvolve quando existem condições que favoreçam sua formação. Observa-se que estas condições que predisõem à formação e ao crescimento do aneurisma podem ser seguidas por circunstâncias que possam levar à ruptura de AI. Estes dados sugerem que uma reação inflamatória e imunológica precede à ruptura de AI. Todavia tais dados não vinculam o início da inflamação a um estágio específico de desenvolvimento do aneurisma, como no caso da aterosclerose e dos aneurismas de aorta ^(166, 167).

Não se sabe se as reações imunológicas e a inflamação são processos primários envolvidos no início ou processos secundários que começam mais tarde durante a evolução da doença, no caso da aterosclerose. Os processos que levam à formação e ruptura do aneurisma são desconhecidos, e a terapia atual depende da obliteração mecânica dos aneurismas e do manejo das consequências da HSA. A HSA apresenta elevada mortalidade e é causa de significativa incapacidade em homens e mulheres de meia-idade ⁽¹⁶⁸⁾.

A maioria dos resultados ruins da doença ocorre como resultado direto e irreversível de uma hemorragia inicial grave. Acredita-se que o reconhecimento e o manejo dos fatores de risco vascular em toda comunidade sejam responsáveis pelo declínio da incidência de certos tipos de doença cerebrovascular ⁽¹⁶⁹⁾.

O conhecimento do remodelamento enzimático que produz inflamação da matriz vascular extracelular está avançando, com a melhor compreensão de mecanismos patológicos compartilhados em uma variedade de doenças vasculares, incluindo aterosclerose, aneurisma da aorta abdominal e arterite. A infiltração da parede arterial por macrófagos e linfócitos T é uma característica precoce e persistente da aterosclerose. As moléculas de adesão da superfície celular, a ativação do complemento, as

citocinas inflamatórias e a liberação de metaloproteinases da matriz participam do desenvolvimento das placas ateroscleróticas, levando ao remodelamento da matriz vascular extracelular e evolução da doença vascular ⁽¹⁷⁰⁾.

Kosierkiewicz et al., ao usarem técnicas de imuno-histoquímica, observaram macrófagos ativados, células T e células *natural killer*, mas não linfócitos B em áreas de ruptura de aneurisma ou afinamento crítico. Grânulos lisossomais, liberados das células inflamatórias e consistentes com um processo destrutivo dependente de proteinase, ocorrem no colo dos aneurismas intracranianos ^(136, 171).

O alto fluxo sanguíneo é um iniciador da formação de AI e as condições de fluxo também conduzem à remodelação da parede que determina se o aneurisma permanecerá estável ou progredirá e, eventualmente, romperá. As células inflamatórias mediam essa remodelação induzida pelo fluxo. No entanto, o fluxo não é o único fator envolvido na formação de AI, nem o único fator que determina a remodelação de sua parede. Compreender o acoplamento mecanobiológico do fluxo e da remodelação da parede do aneurisma é a chave para prever o curso clínico de um aneurisma. Isso tornará cada vez mais importante o estudo de terapias medicamentosas, que possam modular a remodelação inflamatória induzida pelo fluxo arterial aumentado na artéria ⁽¹⁷²⁾.

No presente estudo, foram identificados 16 casos, ou seja, 46%, aproximadamente, da presença do vírus na parede do aneurisma, sendo um da classe do pan-HHV e outros 15 do tipo TTV. Não há significância estatística da relação entre vírus e a ruptura de AI, porém, quantitativamente a presença de vírus foi muito superior nos pacientes que tiveram aneurisma roto, representado por 68%, aproximadamente. Embora não seja estatisticamente significativo é um dado que merece atenção no tocante à compreensão de um possível processo inflamatório envolvido nesses casos. Pacientes que apresentam aneurisma roto tendem a ter maior processo inflamatório envolvido na parede do vaso. Na variável analisada de

aneurismas múltiplos, não houve diferença na análise estatística, entre os grupos de aneurismas múltiplos. Ao analisar somente a presença de TTV e AI roto e não roto, também não houve diferença estatística, muito, provavelmente, em razão do tamanho da amostra.

Com relação aos fatores de risco, os achados da presente tese são semelhantes aos da literatura; ressalta-se que a HAS, história familiar e tabagismo representam fatores de risco importantes na população de AI. No grupo roto, quantitativamente foi mais prevalente, em ordem decrescente, hipertensão arterial, tabagismo e história familiar. Por outro lado, no grupo não roto, foi mais prevalente em ordem decrescente, hipertensão arterial diabetes e tabagismo. A hipertensão arterial esteve como principal fator de risco nos dois grupos e mais presente no grupo roto, mostrando o poder exercido no estresse de cisalhamento na parede do vaso como fator contribuinte para formação da doença aneurismática e sua ruptura. O sexo feminino foi proporcionalmente maior em relação ao masculino, 4,8:1, um pouco superior que na literatura, 3:1. Aneurismas múltiplos representa 40% da amostra e foram mais prevalentes no sexo feminino, correspondendo a 44,8% dos casos ^(1, 11, 15, 16).

O aneurisma mais comum da amostra estudada foi o de ACM, tanto no grupo de AI roto e não roto, correlacionando-se com alguns estudos, porém a associação com a localização não foi estatisticamente significativa, quando comparada com a presença de vírus. No grupo de aneurismas rotos, não esteve presente AI do tipo pericalosa e oftálmica. Por outro lado, o grupo não roto não apresentou AcoP, PICA e AICA. No entanto, aneurisma ACM foi a localização mais prevalente em relação à presença do vírus 7/16 (44%) dos casos totais onde o vírus foi detectado em nossos dados.

Esta tese sustenta a hipótese da relação de infecção viral com a ocorrência de AI. Existem evidências na literatura que endossam a teoria em que existe uma relação direta entre a presença de bactérias e o vírus no trato gastrointestinal e a ocorrência de patologias com componentes inflamatórios, como aterosclerose, DM, fibromialgia e aneurismas ^(11, 16).

Em alguns estudos, foram feitos testes em animais, nos quais os antibióticos foram usados para esgotar a microbiota intestinal e se hipotetizou que a microbiota intestinal contribuiria para a fisiopatologia dos aneurismas, modulando a resposta inflamatória, resultando em menor infiltração de macrófagos e menos expressão de mRNA para citocinas inflamatórias, como MCP-1, IL-1 β , IL-6, iNOS e TNF- α . O mecanismo de formação do aneurisma em humanos é multifatorial, incluindo fatores de risco, inflamação genética e local. Assim, como acontece com qualquer teoria formulada a partir de estudos em animais, a aplicabilidade prática em humanos ainda é incerta ⁽¹¹⁾.

A correlação entre a presença de patógenos endodônticos e periodontais e a ocorrência de doenças inflamatórias no sistema nervoso central é ainda mais forte que a relação com a microbiota intestinal. O DNA bacteriano e os marcadores CD14 e TLR-2 foram encontrados em 60-70% dos casos de pacientes com aneurisma intracraniano, indicando uma relação forte entre infecções dentais e a fisiopatologia da formação do aneurisma. Os achados de patógenos periodontais mais comuns foram o grupo *Streptococcus mitis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* e *Treponema denticola* ^(12, 13, 14).

Diversos estudos mostraram a presença de vírus em sítios específicos de forma crônica e que, de alguma forma, alcançaram o Sistema Nervoso Central e podem desenvolver doenças. Assim, 16 vírus de forma inédita foram documentados e foram analisados na parede do vaso sanguíneo cerebral, corroborando a hipótese de seu papel na formação e ruptura do aneurisma aumentando a fragilidade do vaso em razão do aumento do processo inflamatório e desarranjo da citoarquitetura normal, acrescendo o entendimento de que a infecção viral pode ser um fator de risco silencioso e que, em alguns pacientes, ocorre esse depósito na parede do vaso arterial cerebral e o desenvolvimento de um estado de vulnerabilidade arterial em razão da inflamação causada pela ação local do vírus somada aos fatores de risco inerentes a cada paciente e aos fatores intrínsecos de inflamação.

A população brasileira ainda apresenta condições sociais de baixa renda, escolaridade e problemas sociais que corroboram a hipótese de que pode aumentar o contágio de vírus, consequentemente, favorecer sua cronicidade e todas as alterações citadas no estudo. Populações com riscos sociais apresentam maior predisposição à redução da imunidade, consequentemente, maior viremia. Estudos multicêntricos são necessários para comparar estas hipóteses entre as populações. Os resultados deste estudo destacam também a importância de ampliar o entendimento e esclarecer as relações entre inflamação, reação imunológica e aneurismas cerebrais.

Os AI serão achados cada vez mais frequentes em exames de imagem em razão do advento da tecnologia de neuroimagem, como consequência o desafio em identificar fatores de risco, indicar um tratamento e evitar a ruptura que, por sua vez, leva a HSA, aumenta e ganha importância cada vez mais significativa. O conhecimento de todas as variáveis da doença aneurismática em seus estágios antes de sua formação, ruptura e complicações pós HSA são as chaves para se vencer este desafio. Outro fator importante é o alto fluxo sanguíneo.

Neste estudo é importante discutir o desarranjo na citoarquitetura pela soma de fatores de riscos evitáveis e não evitáveis de cada paciente, e a presença de patógenos, especificadamente, vírus, que podem ser um novo fator de risco, silencioso e até então desconhecido, presente na parede de AI, devido às infecções crônicas. Dessa forma, pode levar à desestruturação das camadas naturais, adicionada ao efeito do fluxo sanguíneo sobre o ponto de fragilidade, levando à formação do AI.

A presença do vírus na parede do AI colabora com a relevância em relação à prevalência do vírus, como fator contribuinte e modificador do processo inflamatório do vaso. O vírus pode exercer um papel no tocante à formação de vasculite no vaso arterial, potencializando o desarranjo das lâminas histológicas dos vasos arteriais cerebrais, aumentando a fragilidade. Todo conhecimento pode ajudar na compreensão e prevenção da formação

e ruptura de AI, tratamento e prognóstico da doença aneurismática. Novos estudos com amostras maiores serão essenciais para determinar a associação com desfecho clínico; a relação exata entre inflamação, infecção viral e formação de AI; o envolvimento de citocinas, peptídeos e biomarcadores. O esclarecimento destes mecanismos poderá ampliar o conhecimento sobre a condição e contribuir para o desenvolvimento de novas intervenções e ações de prevenção da doença aneurismática. Discute-se também a possibilidade do desenvolvimento de vacinas que possam prevenir infecções crônicas virais, dessa forma, reduzir influência viral como fator de risco para desenvolvimento e ruptura de AI.

O aneurisma micótico comporta-se diferentemente desse subgrupo estudado nesta tese. Aqueles ocorrem em pacientes cujas infecções são agudas e muitas vezes o tratamento clínico é suficiente para resolver o caso. Nesses casos investigados, as infecções crônicas e indolentes levam o vaso a se fragilizar ao longo do tempo, predispondo à formação e ruptura do aneurisma. A infestação viral pode levar ao aparecimento de AI e sua ruptura, podendo causar sequelas graves no paciente.

A presente tese eleva a discussão em relação às diversas possibilidades de infecções crônicas que possam colaborar com o processo de formação e ruptura do aneurisma que ainda é desconhecido na literatura. Uma vez presente, o patógeno inicia o processo inflamatório local e uma vasculite sistêmica instala-se, predispondo doença vascular em todo paciente. Na localidade anatômica onde os fatores de risco e a predisposição são maiores, o desenvolvimento de aneurisma pode se tornar presente, elevando muito a mortalidade.

Vídeo esquemático 3D original demonstra a hipótese da infecção viral e a possibilidade de alterações inflamatórias nas camadas do vaso sanguíneo arterial cerebral, podendo levar à formação, ruptura e à HSA (Anexo D). A sua visualização é através do *QRcode*.

6.1 Limitação do estudo

Várias são as limitações deste estudo. Em primeiro lugar, a interpretação dos resultados é limitada pelo pequeno tamanho da amostra, que é corroborado pela dificuldade na elegibilidade do paciente para a coleta do material em centro cirúrgico; no treinamento da equipe para se obter o fragmento da técnica estabelecida, no risco de sangramento intraoperatório, no tratamento endovascular, que reduz o número de amostras obtidas, na severidade clínica, que impossibilita a coleta no ato cirúrgico, nas alterações anatômicas, na dificuldade técnica inerente à complexidade da doença aneurismática, além de complicações cirúrgicas e clínicas decorrentes de HSA. Esse fato é uma dificuldade apresentada também na literatura. No Quadro 1 são evidenciados os principais estudos e suas pequenas amostras, destacando que as dificuldades e limitações para o estudo foram semelhantes às apresentadas nesta tese.

Em segundo lugar, não foi possível fazer a coleta da amostra de PCR perifericamente dos vírus pela limitação de recursos financeiros. Este estudo foi possível pela parceria com o Instituto de Medicina Tropical no Departamento de Virologia (LIM-52) por meio de doação, tornando viável apenas a análise das amostras das paredes dos AIs.

Em terceiro lugar, pelo potencial de dados ausentes pela natureza do estudo. Perdas de seguimento para acompanhamento, problemas na consistência de dados, impossibilidade de seguimento de pacientes a longa distância e desistência da participação do estudo, fizeram com que os dados de acompanhamento clínico, cirúrgico e seguimento ficassem inviáveis para análise.

Inicialmente, o estudo foi projetado para pesquisar também nas mesmas amostras e nas mesmas extrações de DNA a análise de bactérias, como: *Prorphyromonas gingivalis* F, R E Pr, por meio de PCR. Bactérias alvo escolhidas seriam as comuns em cavidade bucal em razão da escolha

do autor. Todavia por causa da SARS-COVID-19 as análises foram canceladas.

Foi aventada a possibilidade de pesquisar citocinas inflamatórias do aneurisma no ato operatório no presente estudo. As fitas para avaliar as citocinas foram doadas pelo IMT, porém, o equipamento utilizado para esterilização do material que dosa as citocinas necessitou de manutenção em toda pandemia, inviabilizando seu uso. Dessa forma, após esse período de pandemia, haverá possibilidade em expandir as análises e continuar a estratégia em pesquisas futuras, bem como o rastreio de citocinas inflamatórias. Todavia, foi necessário ajuste junto ao Comitê de Ética do título e dos métodos para adaptar o novo cenário, sendo autorizado pelo mesmo a adequação, como mostra o Anexo A, B e C.

Estudos futuros são necessários para aumentar a amostra e ampliar testes para outros patógenos, para avaliar periféricamente PCR do patógeno estudado, bem como citosinas inflamatórias da parede, correlacionando com análise clínica e desfecho dos pacientes.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

A presença de infecção por HHV e TTV em amostras de tecidos de AIs foram encontrados em 46% da amostra, sua associação com aneurisma roto foi de 68%. Estes achados mostraram que a infecção por vírus pode contribuir para a fisiopatologia da formação, progressão e ruptura de AI ao modular fatores inflamatórios e imunológicos da parede do vaso.

8 ANEXOS

Anexo A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP - CAAE PROJETO DE PESQUISA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo caso-controle da ocorrência de doença periodontal em pacientes com aneurismas cerebrais: fator causal para rotura

Pesquisador: Eberval Gadelha Figueiredo

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 61719416.6.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.003.416

Apresentação do Projeto:

Estudo clínico, prospectivo incluindo 120 indivíduos, sendo 40 com aneurismas cerebrais rotos, 40 com aneurismas cerebrais não rotos e 40 controles com alterações na coluna vertebral. Será realizada avaliação oral e facial através dos seguintes instrumentos: Ficha Clínica da Equipe de Dor Orofacial/ATM HCFMUSP; Avaliação da dor periodontal através do questionário McGill; Índice CPO-D; Questionário RDC e realização de exame radiográfico de rotina para avaliação odontológica. A avaliação neurológica será realizada através de história prévia e de admissão do doente, característica intraoperatória do Aneurisma e tomografia de admissão. As escalas avaliadas foram: Fisher e Fisher modificado, World Federation of Neurological Surgeons, Hunt - Hess, Glasgow de admissão além de Glasgow outcome no momento da alta.

Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos do estudo são: Comparar a população de pacientes com Aneurismas Cerebrais (Rotos e Não Rotos) com grupo controle de pacientes de coluna vertebral. Correlacionar presença de bactérias periodontais nos grupos selecionados, discutir mecanismo, fisiopatologia, alterações moleculares, inflamação crônica, causada pela colonização crônica das bactérias periorais no vaso arterial cerebral; e estabelecer todos os fatores e discuti-los, como fator de risco, previamente

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappelq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 2.003.416

desconhecidos e silenciosos na população geral, como risco para a doença vascular aneurismática e sua rotura.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O paciente terá o benefício de ser feito diagnóstico e tratamento odontológico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

As correções foram realizadas conforme solicitado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto apresenta os termos de apresentação obrigatória.

Recomendações:

Recomenda-se aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto não apresenta pendências éticas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_740223.pdf	16/02/2017 20:45:23		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Completo.pdf	16/02/2017 20:45:12	Eberval Gadelha Figueiredo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	ANEXO_1_TCLE.pdf	16/02/2017 20:44:58	Eberval Gadelha Figueiredo	Aceito
Brochura Pesquisa	Cadastro_online.pdf	16/02/2017 20:44:32	Eberval Gadelha Figueiredo	Aceito

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira César **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SÃO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappelq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 2.003.416

Folha de Rosto	Folha_de_rosto_Eberval_PB.pdf	15/02/2017 12:36:21	Eberval Gadelha Figueiredo	Aceito
----------------	-------------------------------	------------------------	-------------------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 06 de Abril de 2017

Assinado por:

ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Anexo B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP EMENDA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Análise molecular de vírus em pacientes com aneurismas intracranianos rotos e não rotos

Pesquisador: Eberval Gadelha Figueiredo

Área Temática:

Versão: 6

CAAE: 61719416.6.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.365.165

Apresentação do Projeto:

Este é um protocolo voltado para portadores de aneurisma cerebral e doença periodontal

Objetivo da Pesquisa:

visa analisar possível participação de vírus (bactérias ?) orais na gênese de aneurismas quer se rompam ou não.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A coleta de material de parede aneurismática será feita quando de eventual remoção cirúrgica, não elevando os riscos operatórios

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto encontra-se corretamente elaborado e poderá trazer subsídios para a compreensão da moléstia

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE é aceitável

Recomendações:

Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 4.365.165

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_1649595_E4.pdf	20/10/2020 00:23:46		Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	20/10/2020 00:21:23	Eberval Gadelha Figueiredo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_2020.pdf	17/10/2020 09:28:58	Eberval Gadelha Figueiredo	Aceito
Outros	CARTA.pdf	17/10/2020 09:26:16	Eberval Gadelha Figueiredo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Completo.pdf	17/10/2020 09:25:02	Eberval Gadelha Figueiredo	Aceito
Brochura Pesquisa	Cadastro_online.pdf	16/02/2017 20:44:32	Eberval Gadelha Figueiredo	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 27 de Outubro de 2020

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br

Anexo C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DA PESQUISA

Título da pesquisa - **Análise molecular de vírus em pacientes com aneurismas intracranianos rotos e não rotos.**

Pesquisador principal - Dr. Nicollas Nunes Rabelo, Anderson Rodrigo Souza e Bruna Luiza Roim Varotto

Pesquisadores Responsáveis: Prof. Dr. Eberval Gadelha Figueiredo, Prof. Dr. José Tadeu Tesseroli de Siqueira e Prof Paulo Henrique Braz-Silva.

Departamento/Instituto - Departamento de Neurologia do HCFMUSP/ Instituto Central do Hospital das Clínicas (ICHC)

Convidamos o senhor(a) para participar desta pesquisa, intitulada de **Análise molecular de vírus em pacientes com aneurismas intracranianos rotos e não rotos**. É a respeito da possível relação entre doenças de gengiva, periodontite e aneurismas cerebrais. Algumas doenças da gengiva são infecciosas (presença de bactérias e vírus) e poderiam afetar o vaso cerebral e predispor a formação do aneurisma cerebral. O exame clínico e laboratorial, serão realizados para avaliar a gengiva, a boca e parede do aneurisma o microrganismo periodontal. Estas avaliações já são rotina em nossa instituição, e embora simples pode causar algum desconforto e dor passageira, ou sangramento leve e breve, caso tenha doença gengival. A análise do vaso cerebral, o acesso ao vaso, já faz parte de procedimento da cirurgia. Caso precise de tratamento gengival ele será realizado aqui na instituição ou encaminhado para seu dentista, caso seja sua opção. O objetivo do estudo é comparar um grupo de pacientes com aneurisma cerebrais (Rotos e não rotos) com grupo de pacientes do grupo de cefaleia com exame angiográfico arterial normal, que tenha idade e demais condições de saúde parecidas. A doença periodontal é muito conhecida e relativamente simples de tratar, quando não tratada pode causar problemas importantes de saúde. Neste caso queremos verificar se tem alguma implicação na sua doença neurológica. Iremos incluir análise das amostras a metodologia microbiana e virológica: sequenciamento de PCR genômico da amostra de periodonto e amostra da parede do aneurisma (no grupo de pacientes em que o esvaziamento e manipulação do aneurisma que fazem parte do procedimento, sem prolongar no tempo de manipulação cirúrgica), sem expor ao paciente qualquer outro procedimento

Uma vez identificados quaisquer efeitos relacionados aos exames, as suas execuções serão imediatamente interrompidas e as medidas cabíveis serão tomadas tanto em nível ambulatorial, quanto hospitalar. Piora clínica atribuível à doença de base costuma ser frequente, dados referentes a esta evolução serão coletados durante o seguimento e as medidas terapêuticas serão instituídas de acordo com o protocolo de atendimento do centro em estudo. As avaliações Neurológica e Odontológica serão realizadas através de exame bucal e exame neurológico com aplicação de escalas que permitem medir as alterações. Todo procedimento será previamente explicado e orientado. O material será armazenado imediatamente no ICHC e posteriormente desprezado e analisado, e os questionários, guardados pelos pesquisadores responsáveis. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de alguma conclusão. Entre os benefícios esperados para os pacientes estão: verificação da influência da doença gengival, quando existente, e o devido tratamento, melhor entendimento da doença gengival

Nome resumido do projeto: Análise molecular de vírus em pacientes com aneurismas intracranianos rotos e não rotos.	Confidencial	
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 1.0 de 2018 janeiro a dezembro de 2022		
Nome do pesquisador: Dr. Nicollas Nunes Rabelo, Anderson Rodrigo Souza e Bruna Luiza Roim Varotto Hospital Das Clínicas Da Faculdade De Medicina Da USP	Rubrica do Participante da Pesquisa/Representante legal	Rubrica do Investigador Responsável

Atualizado-dezembro 2019

(periodontal) como fator causal do aneurisma e seus problemas (rotura). Um melhor resultado neurológico, tanto física como emocionalmente, melhora na qualidade de vida e redução da taxa de mortalidade, pode ser esperada, através da identificação precoce dos fatores de risco, como a doença periodontal, bem como direcionamento para tratamento na fase inicial do aneurisma.

Após encerrada a pesquisa, ou mesmo que interrompida, os pacientes estudados manterão seu acompanhamento no ambulatório de neurocirurgia vascular do HCFMUSP, quando submetidos a cirurgias intracranianas, ou no ambulatório de cefaleias, quando provenientes do mesmo. Os dados obtidos serão reunidos e apresentados na forma de artigos científicos para a comunidade nacional e mundial, com a preservação total do sigilo de identidade de cada participante.

Garantias de plena liberdade ao participante de recusar-se a participar ou retirar o seu consentimento em qualquer fase da pesquisa sem penalização alguma, de sigilo e privacidade

Garantia de que o participante receberá uma via do termo de consentimento –

É dada plena garantia de liberdade ao paciente de recusar-se a participar de qualquer etapa ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer tipo de penalização ou quebra de sigilo e privacidade. Não serão implicados nenhum custo financeiro para os participantes, como também não haverá ressarcimentos de quaisquer gastos realizados.

Será feito ressarcimento de despesas decorrentes da pesquisa e explicitação da garantia de indenização por eventuais danos decorrentes da pesquisa, segundo a resolução 466/2012.

O material biológico da saliva e fragmento do aneurisma obtido para esta pesquisa será armazenado de acordo com a resolução 441/2011. Será pedido novo consentimento para o caso de uso futuro, e que toda nova pesquisa só será realizada com aprovação do sistema CEP-CONEP.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa Dr. Nicollas Nunes Rabelo (nicollasrabelo@hotmail.com), Anderson Rodrigo Souza (anderson.rodrigo@me.com) Bruna Luiza Room Varotto (bruna.varotto@hc.fm.usp.br), poderão ser encontrados no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255- 5º andar - Telefone (11)2661-6106, (11)2661-8014, (11)2661-7878. Consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar- tel: (11)2661-7585, (11)2661-1548 ou (11)26611549, email: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Fui suficientemente informado a respeito do estudo " **Análise molecular de vírus em pacientes com aneurismas intracranianos rotos e não rotos.**" Eu discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável (.....) ou pessoa (s) por ele delegada (s) (.....) sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

Nome resumido do projeto: Análise molecular de vírus em pacientes com aneurismas intracranianos rotos e não rotos.	Confidencial
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 1.0 de 2018 janeiro a dezembro de 2022	
Nome do pesquisador: Dr. Nicollas Nunes Rabelo, Anderson Rodrigo Souza e Bruna Luiza Room Varotto Hospital Das Clinicas Da Faculdade De Medicina Da USP	
	<div>Rubrica do Participante da Pesquisa/Rrepresentante legal</div> <div>Rubrica do Investigador Responsável</div>

Atualizado-dezembro 2019

3

----- Data ____/____/____

Assinatura do participante /representante legal

Nome do participante/representante legal

----- Data ____/____/____

Assinatura do responsável pelo estudo

Nome resumido do projeto: Análise molecular de vírus em pacientes com aneurismas intracranianos rotos e não rotos.	Confidencial
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 1.0 de 2018 janeiro a dezembro de 2022	
Nome do pesquisador: Dr. Nicollas Nunes Rabelo, Anderson Rodrigo Souza e Bruna Luiza Roim Varotto Hospital Das Clínicas Da Faculdade De Medicina Da USP	
	Rubrica do Participante da Pesquisa/Rrepresentante legal
	Rubrica do Investigador Responsável

Atualizado dezembro 2019

Anexo D – Vídeo esquemático

Vídeo esquemático 3D demonstrando a hipótese da infecção viral e a possibilidade de alterações nas camadas do vaso sanguíneo arterial cerebral podendo levar a ruptura e a HSA. O vídeo possui audio.

Disponível em:

Para acesso automático segue o QRcode para escanear e acessar o vídeo através da função de foto do celular.

9 REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

1. Lawton MT, Vates GE. Subarachnoid hemorrhage. *N Engl J Med*. 2017;377(3):257-66.
2. Macdonald RL. Delayed neurological deterioration after subarachnoid hemorrhage. *Nat Rev Neurol*. 2014;10(1): 44-58.
3. de Rooij NK, Linn FH, van der Plas JA, Algra A, Rinkel GJE. Incidence of subarachnoid hemorrhage: a systematic review with emphasis on region, age, gender and time trends. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007;78(12):1365-72.
4. Focosi D, Antonelli G, Pistello M, Maggi F. Torquetenovirus (TTV): The human virome from bench to bedside. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22(7):589-93.
5. Patil AK, Azad ZR, Mathew V, Alexander M. Chronic meningitis and central nervous system vasculopathy related to Epstein Barr virus. *Ann Indian Acad Neurol*. 2012;15(4):303-6.
6. Hanson DJ, Hill JA, Koelle DM. Advances in the characterization of the T-cell response to human herpesvirus-6. *Front Immunol*. 2018;9:1454.
7. Clos-Garcia M, Andrés-Marin N, Fernández-Eulate G, Abecia L, Lavín JL, van Liempd S, Cabrera D, Royo F, Valero A, Errazquin N, Vega MCG, Govillard L, Tackett MR, Tejada G, González E, Anguita J, Bujanda L, Orcasitas AMC, Aransay AM, Maíz O, Munain AL, Falcón-Pérez JM. Gut microbiome and serum metabolome analyses identify molecular biomarkers and altered glutamate metabolism in fibromyalgia. *EBioMedicine*. 2019;46:499-511.

8. Hills RD Jr, Pontefract BA, Mishcon HR, Black CA, Sutton SC, Theberge CR. Gut microbiome: profound implications for diet and disease. *Nutrients*. 2019;11(7):1613.
9. Goebel A, Buhner S, Schedel R, Lochs H, Sprotte G. Altered intestinal permeability in patients with primary fibromyalgia and in patients with complex regional pain syndrome. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47(8):1223-7.
10. Choy E, Perrot S, Leon T, Kaplan J, Petersel D, Ginovker A, Kramer E. A patient survey of the impact of fibromyalgia and the journey to diagnosis. *BMC Health Serv Res*. 2010;10:102.
11. Shikata F, Shimada K, Sato H, Ikedo T, Kuwabara A, Furukawa H, Korai M, Kotoda M, Yokosuka K, Makino H, Ziegler EA, Kudo D, Lawton MT, Hashimoto T. Potential influences of gut microbiota on the formation of intracranial aneurysm. *Hypertension*. 2019;73(2):491-6.
12. Pyysalo MJ, Pyysalo LM, Hiltunen J, Järnstedt J, Helminen M, Karhunen PJ, Pessi T. The dental infections in patients undergoing preoperative dental examination before surgical treatment of saccular intracranial aneurysm. *BMC Res Notes*. 2018;11(1):600.
13. Pyysalo MJ, Pyysalo LM, Pessi T, Karhunen PJ, Öhman JE. The connection between ruptured cerebral aneurysms and odontogenic bacteria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84(11):1214-8.
14. Pyysalo MJ, Pyysalo LM, Pessi T, Karhunen PJ, Lehtimäki T, Oksala N, Öhman JE. Bacterial DNA findings in ruptured and unruptured intracranial aneurysms. *Acta Odontol Scand*. 2016;74(4):315-20.
15. Sampson TR, Mazmanian SK. Control of brain development, function, and behavior by the microbiome. *Cell Host Microbe*. 2015;17(5):565-76.

16. Rabelo NN, Rodrigues RS, Massoud Salame AA, Braz-Silva PH, Teixeira MJ, Figueiredo EG. Letter to the Editor. Do bacteria contribute to formation and rupture of intracranial aneurysms? J Neurosurg. 2019 Oct 4;1-2.
17. Rabelo NN, Teixeira MJ, Figueiredo EG. Letter by Rabelo et al regarding article "Potential influences of gut microbiota on the formation of intracranial aneurysm". Hypertension. 2019 Jul;74(1):e1.
18. Balin BJ, Hudson AP. Herpes viruses and Alzheimer's disease: new evidence in the debate. Lancet Neurol. 2018;17(10):839-41.
19. Aboukais R, Loiez C, Leclerc X, Bourgeois P, Wallet F, Menovsky T, Lejeune J-P: Absence of bacteria in intracranial aneurysms. J Neurosurg. 2019 Mar 1;1-5.
20. Boucher Y, Matossian L, Rilliard F, Machtou P. Radiographic evaluation of the prevalence and technical quality of root canal treatment in a French subpopulation. Int Endod J. 2002;35(3):229-38.
21. Bourgeois D, Bouchard P, Mattout C: Epidemiology of periodontal status in dentate adults in France, 2002–2003. J Periodontal Res. 2007;42(3):219-27.
22. Pyysalo MJ, Mishra PP, Sundström K, Lehtimäki T, Karhunen PJ, Pessi T. Increased tooth brushing frequency is associated with reduced gingival pocket bacterial diversity in patients with intracranial aneurysms. PeerJ. 2019;7:e6316.
23. Sodeck G, Domanovits H, Khanakah G, Schillinger M, Thalmann M, Bayegan K, Schoder M, Grabenwoeger M, Hoelzenbein T, Boehmig G, Laggner AN, Stanek G. The role of *Chlamydia pneumoniae* in human aortic

disease-a hypothesis revisited. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2004;28(5):547-52.

24. Gredmark-Russ S, Dzabic M, Rahbar A, Wanhainen A, Björck M, Larsson E, Michel JB, Söderberg-Nauclér C. Active cytomegalovirus infection in aortic smooth muscle cells from patients with abdominal aortic aneurysm. *J Mol Med (Berl)*. 2009;87(4):347-56.

25. Hallikainen J, Lindgren A, Savolainen J, Selander T, Jula A, Närhi M, Koivisto T, Kellokoski J, Ylöstalo P, Suominen AL, Frösen J. Periodontitis and gingival bleeding associate with intracranial aneurysms and risk of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurg Rev*. 2020;43(2):669-79.

26. Moulin D. Ebers papyrus. *Arch Chir Neerl*. 1961;12:49-63.

27. Milinis K, Thapar A, O'Neill, K. History of aneurysmal spontaneous subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 2017;48:e280-e283.

28. Morgagni J. *Sedibus et causis morborum per anatomen indagatis*. Venetis, ex typog. remodiniana. New York, NY: Hafner; 1960. p.1.

29. Blackall J. *Observations on the nature and cure of dropsies*. London, UnitedKingdom: Longman, Hurst, Rees, Orme and Brown; 1813.

30. Keen W. Intracranial lesions. *Med News*. 1890;57:439-49.

31. Cohen-Gadol AA, Spencer DD. Harvey W. Cushing and cerebrovascular surgery: Part I, Aneurysms. *J Neurosurg*. 2004;101(3):547-52.

32. Schievink WI. Intracranial aneurysms. *N Engl J Med*. 1997;336(1):28-40.

33. Alg VS, Sofat R, Houlden H, Werring DJ. Genetic risk factors for intracranial aneurysms: A meta-analysis in more than 116,000 individuals. *Neurology*. 2013;80(23):2154-65.
34. Ronkainen A, Hernesniemi J, Puranen M, Niemitukia L, Vanninen R, Ryyänänen M, Kuivaniemi H, Tromp G. Familial intracranial aneurysms. *Lancet*. 1997;349(9049):380-4.
35. Raaymakers TW; MARS Study Group. Aneurysms in relatives of patients with subarachnoid hemorrhage: Frequency and risk factors. Magnetic resonance angiography in relatives of patients with subarachnoid hemorrhage. *Neurology*. 1999;53(5):982-8.
36. Broderick JP, Brown RD Jr, Sauerbeck L, Hornung R, Huston 3rd J, Woo D, Anderson C, Rouleau G, Kleindorfer D, Flaherty ML, Meissner I, Foroud T, Moomaw ECJ, Connolly ES; FIA Study Investigators. Greater rupture risk for familial as compared to sporadic unruptured intracranial aneurysms. *Stroke*. 2009;40(6):1952-7.
37. Vlak MH, Rinkel GJ, Greebe P, Algra A. Independent risk factors for intracranial aneurysms and their joint effect: A case control study. *Stroke*. 2013;44(4):984-7.
38. Bonita R. Cigarette smoking, hypertension and the risk of subarachnoid hemorrhage: A population-based case-control study. *Stroke*. 1986;17(5):831-5.
39. Longstreth WT, Nelson LM, Koepsell TD, van Belle G. Subarachnoid hemorrhage and hormonal factors in women. A population-based case-control study. *Ann Intern Med*. 1994;121(3):168-73.
40. Mhurchu CN, Anderson C, Jamrozik K, Hankey G, Dunbabin D; Australasian Cooperative Research on Subarachnoid Hemorrhage Study

(ACROSS) Group. Hormonal factors and risk of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: An international population-based, case-control study. *Stroke*. 2001;32(3):606-12.

41. Wijdicks EF, Kallmes DF, Manno EM, Fulgham JR, Piepgras DG. Subarachnoid hemorrhage: neurointensive care and aneurysm repair. *Mayo Clin Proc*. 2005;80(4):550-9.

42. Connolly ES, Solomon RA. Management of unruptured aneurysms. In: Le Roux PD, Winn HR, Newell DW, eds. *Management of cerebral aneurysms*. Philadelphia: Saunders; 2004. p.271-85.

43. Brisman JL, Song JK, Newell DW. Cerebral aneurysms. *N Engl J Med*. 2006;355(9):928-39.

44. Frösen J, Cebal J, Robertson AM, Aoki T. Flow-induced, inflammation-mediated arterial wall remodeling in the formation and progression of intracranial aneurysms. *Neurosurg Focus*. 2019;47(1):E21.

45. Liu Z, Ajimu K, Yalikun N, Zheng Y, Xu F. Potential therapeutic strategies for intracranial aneurysms targeting aneurysm pathogenesis. *Front Neurosci*. 2019;13:1238.

46. Hudson JS, Hoyne DS, Hasan DM. Inflammation and human cerebral aneurysms: current and future treatment prospects. *Future Neurol*. 2013 Nov 1;8(6):10.2217/fnl.13.40.

47. Xie Y, Wu L, Wang M, Cheng A, Yang Q, Wu Y, Jia R, Zhu D, Zhao X, Chen S, Liu M, Zhang S, Wang Y, Xu Z, Chen Z, Ling Zhu, Luo Q, Liu Y, Yu Y, Zhang L, Chen X. Alpha-herpesvirus thymidine kinase genes mediate viral virulence and are potential therapeutic targets. *Front Microbiol*. 2019;10:941.

-
48. Crimi S, Fiorillo L, Bianchi A, D'Amico C, Amoroso G, Gorassini F, Mastroieni R, Marino S, Scoglio C, Catalano F, Campagna P, Bocchieri S, De Stefano R, Fiorillo MT, Cicciù M. Herpes virus, oral clinical signs and qol: systematic review of recent data. *Viruses*. 2019;11(5):463.
 49. Man A, Slevin M, Petcu E, Fraefel C. The cyclin-dependent kinase 5 inhibitor peptide inhibits Herpes simplex virus type 1 replication. *Sci Rep*. 2019;9(1):1260.
 50. Rahn E, Petermann P, Hsu MJ, Rixon FJ, Knebel-Mörsdorf D. Entry pathways of Herpes simplex virus type 1 into human keratinocytes are dynamin- and cholesterol-dependent. *PLoS One*. 2011;6(10):e25464.
 51. Patton ME, Bernstein K, Liu G, Zaidi A, Markowitz LE. Seroprevalence of Herpes simplex virus types 1 and 2 among pregnant women and sexually active, nonpregnant women in the United States. *Clin Infect Dis*. 2018;67(10):1535-42.
 52. Bollaerts K, Riera-Montes M, Heininger U, Hens N, Souverain A, Verstraeten T, Hartwig S. A systematic review of varicella seroprevalence in European countries before universal childhood immunization: deriving incidence from seroprevalence data. *Epidemiol Infect*. 2017;145(13):2666-77.
 53. Mahalingam R, Gershon A, Gershon M, Cohen JI, Arvin A, Zerboni L, Zhu H, Gray W, Messaoudi I, Traina-Dorge V. Current In vivo models of varicella-Zoster virus neurotropism. *Viruses*. 2019;11(6):502.
 54. Nagel MA, Gilden D. Developments in varicella Zoster virus vasculopathy. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2016;16(2):12.
 55. Davis NL, King CC, Kourtis AP. Cytomegalovirus infection in pregnancy. *Birth Defects Res*. 2017;109(5):336-46.

-
56. Liu X, Palaniyandi S, Zhu I, Tang J, Li W, Wu X, Ochsner SP, Pauza CD, Cohen JI, Zhu X. Human cytomegalovirus evades antibody-mediated immunity through endoplasmic reticulum-associated degradation of the FcRn receptor. *Nat Commun.* 2019;10(1):3020.
57. Britt WJ. Congenital human cytomegalovirus infection and the enigma of maternal immunity. *J Virol.* 2017;91(15):e02392-16.
58. Foglierini M, Marcandalli J, Perez L. HCMV envelope glycoprotein diversity demystified. *Front Microbiol.* 2019;10:1005.
59. Naclér CS, Geisler J, Vetvik K. The emerging role of human cytomegalovirus infection in human carcinogenesis: a review of current evidence and potential therapeutic implications. *Oncotarget.* 2019;10(42):4333-47.
60. Collin V, Flamand L. HHV-6A/B integration and the pathogenesis associated with the reactivation of chromosomally integrated HHV-6A/B. *Viruses.* 2017;9(7):160.
61. Pantry SN, Medveczky PG. Latency, integration, and reactivation of human Herpesvirus-6. *Viruses.* 2017;9(7):194.
62. Mullins TB, Krishnamurthy K. Roseola infantum (Exanthema Subitum, Sixth Disease). 2020 Jul 10. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan. 2020 Jul 10.
63. Ongrádi J, Ablashi DV, Yoshikawa T, Stercz B, Ogata M. Roseolovirus-associated encephalitis in immunocompetent and immunocompromised individuals. *J Neurovirol.* 2017;23(1):1-19.
64. Ptaszyńska-Sarosiek I, Dunaj J, Zajkowska A, Niemcunowicz-Janica A, Król M, Pancewicz S, Zajkowska J. Post-mortem detection of six human

herpesviruses (HSV-1, HSV-2, VZV, EBV, CMV, HHV-6) in trigeminal and facial nerve ganglia by PCR. *PeerJ*. 2019;6:e6095.

65. Hill JA, Zerr DM. Roseoloviruses in transplant recipients: clinical consequences and prospects for treatment and prevention trials. *Curr Opin Virol*. 2014;9:53-60.

66. Wallaschek N, Gravel A, Flamand L, Kaufer BB. The putative U94 integrase is dispensable for human herpesvirus 6 (HHV-6) chromosomal integration. *J Gen Virol*. 2016;97(8):1899-903.

67. Krug LT, Pellett PE. Roseolovirus molecular biology: recent advances. *Curr Opin Virol*. 2014;9:170-7.

68. Wolz MM, Sciallis GF, Pittelkow MR. Human herpesviruses 6, 7, and 8 from a dermatologic perspective. *Mayo Clin Proc*. 2012;87(10):1004-14.

69. Mrozek-Gorska P, Buschle A, Pich D, Schwarzmayr T, Fechtner R, Scialdone A, Hammerschmidt W. Epstein-Barr virus reprograms human B lymphocytes immediately in the prelatent phase of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(32):16046-55.

70. Cohen JL. Primary immunodeficiencies associated with EBV disease. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;390(Pt 1):241-65.

71. Kerr JR. Epstein-Barr virus (EBV) reactivation and therapeutic inhibitors. *J Clin Pathol*. 2019;72(10):651-8.

72. Cirone M. EBV and KSHV infection dysregulates autophagy to optimize viral replication, prevent immune recognition and promote tumorigenesis. *Viruses*. 2018;10(11):599.

-
73. Cesarman E, Damania B, Krown SE, Martin J, Bower M, Whitby D. Kaposi sarcoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):9.
74. Koning MT, Brik T, Hagenbeek R, van den Wijngaard I. A case of fulminant Epstein-Barr virus encephalitis in an immune-competent adult. *J Neurovirol*. 2019;25(3):422-5.
75. Poorthuis MHF, Battjes S, Dorigo-Zetsma JW, de Kruijk JR. Primary Epstein-Barr virus infection in immunocompetent patients with acute transverse myelitis and a combination of polyradiculitis and anterior horn syndrome as neurological manifestations. *BMJ Case Rep*. 2018 Aug 29;2018:bcr2018225333.
76. Priyanka S, Kaarthikeyan G, Nadathur JD, Mohanraj A, Kavarthapu A. Detection of cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, and Torque Teno virus in subgingival and atheromatous plaques of cardiac patients with chronic periodontitis. *J Indian Soc Periodontol*. 2017;21(6):456-60.
77. Mancuso R, Sicurella M, Agostini S, Marconi P, Clerici M. Herpes simplex virus type 1 and Alzheimer's disease: link and potential impact on treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2019;17(9):715-31.
78. Hauer L, Pikija S, Schulte EC, Sztriha LK, Nardone R, Sellner J. Cerebrovascular manifestations of herpes simplex virus infection of the central nervous system: a systematic review. *J Neuroinflammation*. 2019;16(1):19.
79. Al-Ghamdi A. Role of Herpes simplex virus-1, cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in atherosclerosis. *Pak J Pharm Sci*. 2012;25(1):89-97.
80. Wu YP, Sun DD, Wang Y, Liu W, Yang J. Herpes simplex virus type 1 and type 2 infection increases atherosclerosis risk: evidence based on a meta-analysis. *Biomed Res Int*. 2016;2016:2630865.

-
81. Pandey JP, LeRoy E C. Human cytomegalovirus and the vasculopathies of autoimmune diseases (especially scleroderma), allograft rejection, and coronary restenosis. *Arthritis Rheum.* 1998;41(1):10-5.
82. Neidhart M, Kuchen S, Distler O, Brühlmann P, Michel BA, Gay RE, Gay S. Increased serum levels of antibodies against human cytomegalovirus and prevalence of autoantibodies in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 1999;42(2):389-92.
83. Lindholt JS, Shi G-P. Chronic inflammation, imune response, and infection in abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2006;31(5):453-63.
84. Söderberg-Nauclér C. Does cytomegalovirus play a causative role in the development of various inflammatory diseases and cancer? *J Intern Med.* 2006;259(3):219-46.
85. Zhou YF, Leon MB, Waclawiw MA, Popma JJ, Yu ZX, Finkel T, Epstein SE. Association between prior cytomegalovirus infection and the risk of restenosis after coronary atherectomy. *N Engl J Med.* 1996;335(9):624-30.
86. Soderberg-Naucler C, Dzabic M, Rahbar A. Understanding the molecular mechanisms involved in indirect effects of cytomegalovirus. *Trends in Transplant.* 2008;2:32-43.
87. Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;241(1):92-7.
88. Biagini P, Todd D, Bendinelli M, Hino S, Mankertz A, Mishiro S, et al. Anellovirus. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA.

Virus Taxonomy. Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London: Academic Press; 2004. p. 335-41.

89. Hino S, Miyata H. Torque teno virus (TTV): current status. *Rev Med Virol*. 2007;17(1):45-57.

90. Simmonds P, Davidson F, Lycett C, Prescott LE, MacDonald DM, Ellender J, Yap PL, Ludlam CA, Haydon GH, Gillon J, Jarvis LM. Detection of a novel DNA virus (TTV) in blood donors and blood products. *Lancet*. 1998;352(9123):191-5.

91. Okamoto H, Akahane Y, Ukita M, Fukuda M, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. Fecal excretion of a nonenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A-G hepatitis. *J Med Virol*. 1998;56(2):128-32.

92. Inami T, Konomi N, Arakawa Y, Abe K. High prevalence of TT virus in human saliva and semen. *J Clin Microbiol*. 2000;38 (6):2407-8.

93. Calcaterra S, Zaniratti MS, Serraino D, Peroni M, Abbate I, Capiello G, Piselli P, Pavia C, Rezza G, Ippolito G, Capobianchi MR. Cervicovaginal shedding of TT virus in HIV-infected women. *J Hum Virol*. 2001;4 (6):343-5.

94. Krekulova L, Rehak V, Killoran P, Madrigal N, Riley LW. Genotypic distribution of TT virus (TTV) in a Czech population: evidence for sexual transmission of the virus. *J Clin Virol*. 2001;23(1-2):31-41.

95. Morrica A, Maggi F, Vatteroni ML, Fornai C, Pistello M, Ciccorossi P, Grassi F, Gennazzani A, Bendinelli M. TT virus: evidence for transplacental transmission. *J Infect Dis*. 2000;181(2):803-4.

96. Gerner P, Oettinger R, Gerner W, Falbrede J, Wirth S. Mother-to-infant transmission of TT virus: prevalence, extent and mechanism of vertical transmission. *Pediatr Infect Dis J*. 2000;19(11):1074-7.

-
97. Maggi F, Pifferi M, Fornai C, Andreoli E, Tempestini E, Vatteroni M, Presciuttini S, Marchi S, Pietrobelli A, Boner A, Pistello M, Bendinelli M. TT virus in the nasal secretions of children with acute respiratory diseases: relations to viremia and disease severity. *J Virol*. 2003;77 (4):2418-25.
98. Leary TP, Erker JC, Chalmers ML, Desai SM, Mushahwar IK. Improved detection for TT virus reveal high prevalence in humans, non-human primates and farm animals. *J Gen Virol*. 1999;80 (8):2115-20.
99. Prescott LE, MacDonald DM, Davidson F, Mokili J, Pritchard DI, Arnot DE, Riley EM, Greenwood BM, Hamid S, Saeed AA, McClure MO, Smith DB, Simmonds P. Sequence diversity of TT virus in geographically dispersed human populations. *J Gen Virol*. 1999;80(Pt 7):1751-8.
100. Bassit L, Takei K, Hoshino-Shimizu S, Nishiya AS, Sabino EC, Bassitt RP, Focaccia R, D'Amico E, Chamone DF, Ribeiro-dos-Santos G. New prevalence estimate of TT virus (TTV) infection in low and high-risk population from São Paulo, Brasil. *Rev Inst. Med Trop*. 2002;44(4):233-4.
101. Vasconcelos HC, Menezes ME, Niel C. TT virus infection in children and adults who visited a general hospital in the south of Brazil for routine procedure. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96(4):519-22.
102. Watanabe MAE, Miranda HC, Oliveira KB, Oliveira CEC, Tristão FSM, Duarte LM, Silva LL, Corte AC, Guarnier FA, Kaminami MS. Aspectos patológicos, imunológicos e propriedades moleculares do TT vírus. *J Bras Patol Med Lab*. 2005;41(4):223-8.
103. Christensen JK, Eugen-Oslen J, Sørensen M, Ullum H, Gjedde SB, Pedersen BK, Nielsen JO, Krogsgaard K. Prevalence and prognostic significance of infection with TT virus in patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis*, 2000;181(5):1796-9.

104. Diniz-Mendes L, Devalle S, Niel C. Genomic characterization of Brazilian TT virus isolate closely related to SEN virus-F. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99(3):301-6.
105. Gergely Jr P, Pearl A, Poór G. Possible pathogenic nature of the recently discovered TT virus: Does it play a role in autoimmune rheumatic diseases? *Autoimmun Rev*. 2006;6(1):5-9.
106. Charest AJ, Plummer JD, Long SC, Carducci A, Verani M, Sidhu JP. Global occurrence of Torque teno virus in water systems. *J Water Health*. 2015;13(3):777-89.
107. Vecchia AD, Kluge M, dos Santos da Silva JV, Comerlato J, Rodrigues MT, Fleck JD, Luz RB, Teixeira TF, Toehe PM, Capalonga R, Oliveira AB, Spilki FR. Presence of Torque teno virus (TTV) in tap water in public schools from Southern Brazil. *Food Environ Virol*. 2013;5(1):41-5.
108. Mendes L, Paula VS, Luz SL, Niel C. High prevalence of human Torque teno virus in streams crossing the city of Manaus, Brazilian Amazon. *J Appl Microbiol* 2008;105(1):51-8.
109. Verani M, Casini B, Battistini R, Pizzi F, Rovini E, Carducci A. One-year monthly monitoring of Torque teno virus (TTV) in river water in Italy. *Water Sci Technol* 2006;54(3):191-5.
110. Carducci A, Verani M, Lombardi R, Casini B, Privitera G. Environmental survey to assess viral contamination of air and surfaces in hospital settings. *J Hosp Infect*. 2011;77(3):242-7.
111. Beland K, Dore-Nguyen M, Gagne MJ, Patey N, Brassard J, Alvarez F, Halac U. Torque Teno virus in children who underwent orthotopic liver transplantation: new insights about a common pathogen. *J Infect Dis*. 2014;209(2):247-54.

112. Görzer I, Haloschan M, Jaksch P, Klepetko W, Puchhammer-Stockl E. Plasma DNA levels of Torque teno virus and immunosuppression after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2014;33(3):320-3.
113. Ikeda H, Takasu M, Inoue K, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M. Infection with an unenveloped DNA virus (TTV) in patients with acute or chronic liver disease of unknown etiology and in those positive for hepatitis C virus RNA. *J Hepatol*. 1999;30(2):205-12.
114. Pifferi M, Maggi F, Caramella D, De Marco E, Andreoli E, Meschi S, Macchia P, Bendinelli M, Boner AL. High torquetenovirus loads are correlated with bronchiectasis and peripheral airflow limitation in children. *Pediatr Infect Dis J*. 2006;25(9):804-8.
115. Shirai T, Hirose S. Molecular pathogenesis of SLE. *Springer Semin Immunopathol*. 2006;28(2):79-82.
116. Graham KL, Utz PJ. Sources of autoantigens in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol*. 2005;17(5):513-7.
117. Kooistra K, Zhang YH, Henriquez NV, Weiss B, Mumberg D, Noteborn MH. TT virus- derived apoptosis-inducing protein induces apoptosis preferentially in hepatocellular carcinoma-derived cells. *J Gen Virol*. 2004;85(Pt 6):1445-50.
118. Virchow R. Ueber die akute entzündung der arterien. *Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medicin*. 1847;1:272–378.
119. Chyatte D, Bruno G, Desai S, Todor DR. Inflammation and intracranial aneurysms. *Neurosurgery*. 1999;45(5):1137-46; discussion 1146-7.

120. Maass U. Die syphilis als häufigste ursache der aneurysmen an der gehirnbasis. *Beitr Paht Anat.* 1937;98:307-22.
121. Hassler O. Morphological studies on the large cerebral arteries, with reference to the aetiology of subarachnoid haemorrhage. *Acta Psychiatr Scand Suppl.* 1961;154:1-145.
122. Sarti C, Tuomilehto J, Salomaa V, Sivenius J, Kaarsalo E, Narva EV, Salmi K, Torppa J. Epidemiology of subarachnoid hemorrhage in Finland from 1983 to 1985. *Stroke.* 1991;22(7):848-53.
123. Stehbens WE. Etiology of intracranial berry aneurysms. *J Neurosurg.* 1989;70(6):823-31.
124. Hashimoto N, Handa H, Nagata I, Hazama F. Animal model of cerebral aneurysms: pathology and pathogenesis of induced cerebral aneurysms in rats. *Neurol Res.* 1984;6(1-2):33-40.
125. Kataoka K, Taneda M, Asai T, Kinoshita A, Ito M, Kuroda R. Structural fragility and inflammatory response of ruptured cerebral aneurysms. A comparative study between ruptured and unruptured cerebral aneurysms. *Stroke.* 1999;30(7):1396-401.
126. Frösen J, Piippo A, Paetau A, Kangasniemi M, Niemelä M, Hernesniemi J, Jääskeläinen J. Remodeling of saccular cerebral artery aneurysm wall is associated with rupture: histological analysis of 24 unruptured and 42 ruptured cases. *Stroke.* 2004;35(10):2287-93.
127. Laaksamo E, Tulamo R, Baumann M, Dashti R, Hernesniemi J, Juvela S, Niemelä M, Laakso A. Involvement of mitogen-activated protein kinase signaling in growth and rupture of human intracranial aneurysms. *Stroke.* 2008;39(3):886-92.

128. Takagi Y, Ishikawa M, Nozaki K, Yoshimura S, Hashimoto N. Increased expression of phosphorylated c-Jun amino-terminal kinase and phosphorylated c-Jun in human cerebral aneurysms: role of the c-Jun amino-terminal kinase/c-Jun pathway in apoptosis of vascular walls. *Neurosurgery*. 2002;51(4):997-1002.
129. Nakajima N, Nagahiro S, Sano T, Satomi J, Satoh K. Phenotypic modulation of smooth muscle cells in human cerebral aneurysmal walls. *Acta Neuropathol*. 2000;100(5):475-80.
130. Hara A, Yoshimi N, Mori H. Evidence for apoptosis in human intracranial aneurysms. *Neurol Res*. 1998;20(2):127-30.
131. Pentimalli I, Modesti A, Vignati A, Marchese E, Albanese A, Di Rocco F, Coletti A, Di Nardo P, Fantini C, Tirpakova B, Maira G. Role of apoptosis in intracranial aneurysm rupture. *J Neurosurg*. 2004;101(6):1018-25.
132. Guo F, Li Z, Song L, Han T, Feng Q, Guo Y, Xu J, He M, You C. Increased apoptosis and cysteinyl aspartate specific protease-3 gene expression in human intracranial aneurysm. *J Clin Neurosci*. 2007;14(6):550-5.
133. Holling M, Jeibmann A, Gerss J, Fischer BR, Wassmann H, Paulus W, Hasselblatt M, Albert FK. Prognostic value of histopathological findings in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. 2009;110(3):487-91.
134. Crawford T. Some observations on the pathogenesis and natural history of intracranial aneurysms. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1959;22(4):259-66.
135. Crompton MR. Mechanism of growth and rupture in cerebral berry aneurysms. *Br Med J*. 1966;1(5496):1138-42.

136. Kosierkiewicz TA, Factor SM, Dickson DW. immunocytochemical studies of atherosclerotic lesions of cerebral berry aneurysms. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1994;53(4):399-406.
137. Jamous MA, Nagahiro S, Kitazato KT, Tamura T, Aziz HA, Shono M, Satoh K. Endothelial injury and inflammatory response induced by hemodynamic changes preceding intracranial aneurysm formation: experimental study in rats. *J Neurosurg.* 2007;107(2):405-11.
138. Aoki T, Kataoka H, Morimoto M, Nozaki K, Hashimoto N. Macrophage-derived matrix metalloproteinase-2 and -9 promote the progression of cerebral aneurysms in rats. *Stroke.* 2007;38(1):162-9.
139. Aoki T, Kataoka H, Ishibashi R, Nozaki K, Egashira K, Hashimoto N. Impact of monocyte chemoattractant protein-1 deficiency on cerebral aneurysm formation. *Stroke.* 2009;40(3):942-51.
140. Stehbens WE. Histopathology of cerebral aneurysms. *Arch Neurol.* 1963;8:272-85.
141. Chien S. Effects of disturbed flow on endothelial cells. *Ann Biomed Eng.* 2008;36(4):554-62.
142. Cao Y, Zhao J, Wang S, Zhong H, Wu B. Monocyte chemoattractant protein-1 mrna in human intracranial aneurysm walls. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.* 2002;36(7):519-21.
143. Krischek B, Kasuya H, Tajima A, Akagawa H, Sasaki T, Yoneyama T, Ujiie H, Kubo O, Bonin M, Takakura K, Hori T, Inoue I. Network-based gene expression analysis of intracranial aneurysm tissue reveals role of antigen presenting cells. *Neuroscience.* 2008;154(4):1398-407.

144. Shi C, Awad IA, Jafari N, Lin S, Du P, Hage ZA, Shenkar R, Getch CC, Bredel M, Batjer HH, Bendok BR. Genomics of human intracranial aneurysm wall. *Stroke*. 2009;40(4):1252-61.
145. Aoki T, Kataoka H, Shimamura M, Nakagami H, Wakayama K, Moriwaki T, Ishibashi R, Nozaki K, Morishita R, Hashimoto N. NF-kappaB is a key mediator of cerebral aneurysm formation. *Circulation*. 2007;116(24):2830-40.
146. Takeya M, Yoshimura T, Leonard EJ, Takahashi K. Detection of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerotic lesions by an anti-monocyte chemoattractant protein-1 monoclonal antibody. *Hum Pathol*. 1993;24(5):534-9.
147. Tulamo R, Frösen J, Junnikkala S, Paetau A, Kangasniemi M, Peláez J, Hernesniemi J, Niemelä M, Meri S. Complement system becomes activated by the classical pathway in intracranial aneurysm walls. *Lab Invest*. 2010;90(2):168-79.
148. Packard RR, Lichtman AH, Libby P. Innate and adaptive immunity in atherosclerosis. *Semin Immunopathol*. 2009;31(1):5-22.
149. Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(7):508-19.
150. Liu Y, Chen BP, Lu M, Zhu Y, Stemerman MB, Chien S, Shyy JY. Shear stress activation of SREBP1 in endothelial cells is mediated by integrins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(1):76-81.
151. Tulamo R, Frösen J, Junnikkala S, Paetau A, Kangasniemi M, Peláez J, Hernesniemi J, Niemelä M, Meri S. Complement system becomes activated by the classical pathway in intracranial aneurysm walls. *Lab Invest*. 2010;90(2):168-79.

152. Boyle JJ. Macrophage activation in atherosclerosis: pathogenesis and pharmacology of plaque rupture. *Curr Vasc Pharmacol*. 2005;3(1):63-8.
153. Kilic T, Sohrabifar M, Kurtkaya O, Yildirim O, Elmaci I, Günel M, Pamir MN. Expression of structural proteins and angiogenic factors in normal arterial and unruptured and ruptured aneurysm walls. *Neurosurgery*. 2005;57(5):997-1007.
154. Moriwaki T, Takagi Y, Sadamasa N, Aoki T, Nozaki K, Hashimoto N. Impaired progression of cerebral aneurysms in interleukin-1beta-deficient mice. *Stroke*. 2006;37(3):900-5.
155. Jayaraman T, Berenstein V, Li X, Mayer J, Silane M, Shin YS, Niimi Y, Kiliç T, Gunel M, Berenstein A. Tumor necrosis factor alpha is a key modulator of inflammation in cerebral aneurysms. *Neurosurgery*. 2005;57(3):558-64.
156. Shimizu K, Mitchell RN, Libby P. Inflammation and cellular immune responses in abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(5):987-94.
157. Wohner N. Role of cellular elements in thrombus formation and dissolution. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2008;6(3):224-8.
158. Peterson JW, Kwun BD, Teramura A, Hackett JD, Morgan JA, Nishizawa S, Bun T, Zervas NT. Immunological reaction against the aging human subarachnoid erythrocyte. a model for the onset of cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. 1989;71(5 Pt 1):718-26.
159. Frösen J, Marjamaa J, Myllärniemi M, Abo-Ramadan U, Tulamo R, Niemelä M, Hernesniemi J, Jääskeläinen J. Contribution of mural and bone marrow-derived neointimal cells to thrombus organization and wall

remodeling in a microsurgical murine saccular aneurysm model. *Neurosurgery*. 2006;58(5):936-44.

160. Lee D, Yuki i, Murayama Y, Chiang A, Nishimura I, Vinters HV, Wang CJ, Nien YL, Ishil A, Wu BM, Viñuela F. Thrombus organization and healing in the swine experimental aneurysm model. Part I. A histological and molecular analysis. *J Neurosurg*. 2007;107(1):94-108.

161. Juvela S. Natural history of unruptured intracranial aneurysms: risks for aneurysm formation, growth, and rupture. *Acta Neurochir Suppl*. 2002;82:27-30.

162. Deleo MJ, Gounis MJ, Hong B, Ford JC, Wakhloo AK, Bogdanov AA Jr. Carotid artery brain aneurysm model: in vivo molecular enzyme-specific MR imaging of active inflammation in a pilot study. *Radiology*. 2009;252(3):696-703.

163. Flores BC, Patel AR, Braga BP, Weprin BE, Batjer HH. Management of infectious intracranial aneurysms in the pediatric population. *Childs Nerv Syst*. 2016;32(7):1205-17.

164. Tozetto-Mendoza TR, Bongiovanni AM, Minis E, Linhares IM, Boester A, Freire WS, Lima SH, de Oliveira NPG, Mendes-Correa MC, Forney LJ, Witkin SS. Torquetenovirus titer in vaginal secretions from pregnant and postpartum women: association with absence of *Lactobacillus crispatus* and levels of lactic acid and matrix metalloproteinase-8. *Reprod Sci*. 2020;27(11):2075-81.

165. Johnson G, Nelson S, Petric M, Tellier R. Comprehensive PCR-based assay for detection and species identification of human herpesviruses. *J Clin Microbiol*. 2000;38(9):3274-9.

-
166. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352(16):1685-95.
167. Apella JF, Paik DC, Yin NX, Gervasoni JE, Tilson MD. Complement activation and subclassification of tissue immunoglobulin G in the abdominal aortic aneurysm. *J Surg Res*. 1996;65(1):31-3.
168. King JT Jr: Epidemiology of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neuroimaging Clin N Am*. 1997;7(4):659-68.
169. Gregory AK, Yin NX, Capella J, Xia S, Newman KM, Tilson MD. Features of autoimmunity in the abdominal aortic aneurysm. *Arch Surg*. 1996;131(1):85-8.
170. Li Z, Li L, Zielke HR, Cheng L, Xiao R, Crow MT, Stetler-Stevenson WG, Froehlich J, Lakatta EG. Increased expression of 72-kd type IV collagenase (MMP-2) in human aortic atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*. 1996;148(1):121-8.
171. Cajander S, Hassler O. Enzymatic destruction of the elastic lamella at the mouth of cerebral berry aneurysm?. *Acta Neurol Scand*. 1976;53(3):171-81.
172. Alfano JM, Kolega J, Natarajan SK, Xiang J, Paluch RA, Levy EI, Siddiqui AH, Meng H. Intracranial aneurysms occur more frequently at bifurcation sites that typically experience higher hemodynamic stresses. *Neurosurgery*. 2013;73(3):497-505.
173. Jang IK, Lassila R, Fuster V: Atherogenesis and inflammation. *Eur Heart J*. 1993;14 [Suppl K]: 2-6.
174. Fellner MD, Durand K, Rodriguez M, Irazu L, Alonio V, Picconi MA. Duplex realtime PCR method for and human DNA quantification: its

application for post-transplant lymphoproliferative disorders detection. *Braz J Infect Dis.* 2014;18(3):271-80.

10 APÊNDICES

10 APÊNDICES

Apêndice A – Trabalho apresentado no GLOBAL NEUROSURGERY:

Ask Not for Whom the Bell Tolls Virtual Symposium, realizado no período de 10 a 12 de setembro de 2020, no formato virtual ao vivo.

Título do trabalho: Torque teno vírus (TTV) infection as potential influence in Intracranial Aneurysm formation.

Apêndice B – Trabalho publicado na revista *Hypertension* em 2019.

Título do trabalho: “Letter by Rabelo et al Regarding article Potential influences of gut Microbiota on the Formation of Intracranial Aneurysm.”

Letter to the Editor

Letters to the Editor are not a regular feature of Hypertension and if deemed suitable, will be published only as space permits. Letters may be considered by the editors on a case basis to encourage transparency and reproducibility in science.

Letter by Rabelo et al Regarding Article “Potential Influences of Gut Microbiota on the Formation of Intracranial Aneurysm”

To the Editor:

We have read with great attention the article by Shikata et al.¹ First, we would like to congratulate the authors. It is indeed a fascinating article with potential significant implication on the study of intracranial aneurysm (IA).

The background information about aneurysm development, its structural weakening, and rupture is still poorly understood. Risk factors for aneurysm formation include age, female, sex, smoking, high blood pressure, excessive alcohol consumption, and family history of an aneurysm. Many studies are trying to link focal bacteria with chronic infection as a promoter of vascular systemic inflammatory changes seen in the aneurysm wall, such as T cells and macrophage infiltration and complement activation.^{2,3}

The author analyzed the role of gut microbiota in mice on the formation of experimental IA. We think some analytical issues are worth discussing. Like any animal-tested hypothesis, it is still in doubt about practical applicability in human of these data and how much it impacts our understanding. The mechanism of aneurysm formation in humans is multifactorial and includes genetic, local inflammation, and risk factor exposure like mentioned. Animals are not affected by simultaneous factors and portray artificial scenario. We also don't know the prevalence of gut pathogenic in mice when compared with human subjects.¹⁻³

In addition, relevant issues were neglected in the discussion. First, the authors deprive the gut microbiota using an association of 4 antibiotics. Indeed, one cannot exclude the direct effect of one of the drugs, or even of their association, on the prevalence of induced IA and on its associated inflammatory response as well. Similarly, the findings may also be due to the depletion of the microbiota in other locations, including oral cavity or upper respiratory tract.

Indeed, Pyysalo et al²⁻⁴ have implied dental infection and odontogenic bacteria in the genesis of IA. Therefore, depletion of the oral microbiota, instead of the gut microbiota, could be the phenomena responsible for the study's findings. Case-control studies addressing the profile of microbiota in patients with and without IA would be a step further in addressing these important questions. In any case, the authors should be congratulated for bringing to light these thoughtful insights in the genesis of IA.

Sources of Funding

None.

Disclosures

None.

Nicollas Nunes Rabelo
Manoel Jacobsen Teixeira
Eberval Gadelha Figueiredo
University of São Paulo
Brazil

References

- Shikata F, Shimada K, Sato H, Ikeda T, Kuwabara A, Furukawa H, Korai M, Kotoda M, Yokosuka K, Makino H, Ziegler EA, Kudo D, Lawton MT, Hashimoto T. Potential influences of gut microbiota on the formation of intracranial aneurysm. *Hypertension*. 2019;73:491–496. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11804
- Pyysalo MJ, Pyysalo LM, Hiltunen J, Järnstedt J, Helminen M, Karhunen PJ, Pessi T. The dental infections in patients undergoing preoperative dental examination before surgical treatment of saccular intracranial aneurysm. *BMC Res Notes*. 2018;11:600. doi: 10.1186/s13104-018-3704-z
- Pyysalo MJ, Pyysalo LM, Pessi T, Karhunen PJ, Ohman JE. The connection between ruptured cerebral aneurysms and odontogenic bacteria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84:1214–1218. doi: 10.1136/nnsp-2012-304635
- Pyysalo MJ, Pyysalo LM, Pessi T, Karhunen PJ, Lehtimäki T, Oksala N, Ohman JE. Bacterial DNA findings in ruptured and unruptured intracranial aneurysms. *Acta Odontol Scand*. 2016;74:315–320. doi: 10.3109/00016357.2015.1130854

Apêndice C – Trabalho publicado na revista *Journal of Neurosurgery* em 2019.

Título do trabalho: Letter to the editor – “Do bacteria contribute to formation and rupture of intracranial aneurysm?”

Neurosurgical Forum

LETTERS TO THE EDITOR

Do bacteria contribute to formation and rupture of intracranial aneurysms?

TO THE EDITOR: We read the article by Aboukais et al.¹ with great interest (Aboukais R, Loiez C, Leclerc X, et al: Absence of bacteria in intracranial aneurysms. *J Neurosurg* [epub ahead of print March 1, 2019. DOI: 10.3171/2018.12.JNS183044]).

First, we would like to congratulate the authors for trying to identify other inherent risks factors associated with intracranial aneurysm (IA) formation and rupture.

Aboukais et al. conducted a prospective study of 30 French patients treated between January and July 2018, including analysis of specimens from 10 ruptured and 20 unruptured IA walls obtained intraoperatively after microsurgical clipping. In addition, the authors compared their results with those of previous Finnish studies⁴⁻⁶ in which analyses of odontogenic bacteria showed an association of oral infection and saccular IA formation and rupture.^{4,5} However, some methodologic and analytical issues should be discussed.

The data in the study by Aboukais et al. may have been compromised due to a low number of cases (n = 30) managed in only one center, in comparison with the 70 cases examined in the Finnish study.⁴ Moreover, Aboukais et al. did not use a control group to compare the ruptured and unruptured IA data for the study patients to the general population.

These authors argue that the higher prevalence of bacteria found in the Finnish study aneurysms is due to more frequent tooth brushing in this population. However, to our knowledge, there are no supporting data for this assertion in the literature. Nevertheless, Aboukais et al. suggest that brushing teeth regularly prevents periodontitis and that possible microtrauma formation caused by brushing is not sufficient to explain the transitory bacteremia, and therefore it is likely that these microtraumas bias inflammatory changes and facilitate the movement of bacteria into the blood. This explanation, in our opinion, may be due to an ecological inference fallacy, because periodontitis infection can change the mouth microbiota and induce systemic inflammatory changes. However, we believe that Aboukais et al. reached this false-negative finding because their investigation only analyzed 2 bacteria species, *Esch-*

erichia coli and *Staphylococcus aureus*, neither of which is commonly found in the oral cavity. In our experience, other pathogens such as *Fusobacterium* and *Treponema* are prevalent in the oral cavity.

Several factors can influence IA formation and rupture, and studies like those we discuss here can give rise to a new understanding of the underlying pathophysiology.^{4,5} Periodontitis and periapical lesions facilitate chronic inflammatory changes, and inflammation modifies the microenvironment of the oral cavity. Bacteria may then migrate via blood circulation and be deposited into the cerebral vessels, promoting new inflammatory responses and adjusting the vessel wall quality. Therefore, chronic periodontal inflammation by bacteria can lead to systemic inflammation that could be a cause of IA rupture because of wall changes such as apoptosis, infiltration of T cells and macrophages, and complement activation.⁴ This condition is in addition to the traditional risk factors for IA formation, including being younger than 50 years and female, hyperlipidemia, smoking, aneurysm size ratio, polycystic kidney disease, old cerebral infarct, multiple aneurysms, Marfan and collagen syndromes, systemic arterial hypertension, family history, and Japanese or Finnish ethnicity.^{2,3}

Therefore, it is necessary to perform further comparative studies to establish the exact roles and relationships of odontogenic bacteria, oral infection, and IA to understand the pathophysiology of aneurysm rupture and formation. In any case, the authors should be congratulated for continuing this interesting debate and for bringing to light these thoughtful insights into the genesis of IA.

Nicollas Nunes Rabelo, MD
Renan Salomão Rodrigues, MD
Arthur Araújo Massoud Salame, MD
Paulo Henrique Braz-Silva, DDS, PhD
Manoel Jacobsen Teixeira, MD, PhD
Eberval Gadelha Figueiredo, MD, PhD
University of São Paulo, São Paulo, Brazil

References

1. Aboukais R, Loiez C, Leclerc X, Bourgeois P, Wallet F, Menovsky T, et al: Absence of bacteria in intracranial aneurysms. *J Neurosurg* [epub ahead of print March 1, 2019. DOI: 10.3171/2018.12.JNS183044]
2. Boucher Y, Matossian L, Rilliard F, Machou P: Radio-

Apêndice D

Trabalho aceito para publicação no *Journal of Neurosurgery*: Human Herpesvirus DNA occurrence in intracranial aneurysmal wall: illustrative case.

07/06/2021

CASE21-301R2

	Home	For Authors	For Reviewers	Helpful Tips	JNSPG Submission Sites	JNSPG Website	Logout	Change Journal	

This is a revised manuscript.

Manuscript #	CASE21-301R2
Current Revision #	2
Other Versions	CASE21-301 CASE21-301R1
Submission Date	2021-05-30 00:06:54
Current Stage	
Title	Human Herpesvirus DNA Occurrence in Intracranial Aneurysmal Wall: Illustrative Case
Manuscript Type	Case Lesson
Supplement	N/A
Category	Infection
Authors	<ol style="list-style-type: none"> 1 Dr. Nicollas Rabelo (Universidade de Sao Paulo) (corr-auth) 2 Mr. Antonio Carlos Samaia da Silva Coelho (University of São Paulo) 3 Mr. Joao Paulo Telles (University of São Paulo) 4 Dr. Giselle Coelho (Pediatric Neurosurgery Center / CENEPB) 5 Mr. Caio de Souza (University of São Paulo) 6 Ms. Tania Tozetto-Mendoza (University of São Paulo) 7 Mr. Natan Galvani de Oliveira (University of São Paulo) 8 Prof. Paulo Braz-Silva (University of São Paulo School of Dentistry, São Paulo, SP, Brazil) 9 Dr. Manoel Teixeira (Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), São Paulo, Brazil) 10 Prof. Eberval Figueiredo (University of São Paulo Medical School, São Paulo, SP, Brazil)
Abstract	Assigned
Associate Editor	Intracranial aneurysm, Intracranial hemorrhage, Subarachnoid hemorrhage, Human Herpesvirus (HHV), Inflammation
Keywords	No
Preprint Server	No
Funding Body Archiving Mandates	No Funders
AANS Membership	Yes
	474400
	Abstract word count (200 words max):
	198
	Text word count (3000 words max):
	1831
	Number of references (45 max):
	16
Word counts and supporting elements - Case Lesson	Number of figures (figures/tables 5 max):
	4
	Number of tables (figures/tables 5 max):
	0
	Number of videos (2 max):
	0
	Did your study require patient informed consent to treatment? Note: This information should also be included in the manuscript, if applicable.:
	No
Patient Informed Consent	<p>If you replied "No", please explain why. (Was the case a situation in which emergency surgery was performed in a patient or a patient was comatose and therefore could not provide consent to treatment? Was your study a cadaveric study? Was your study a retrospective study; if so, was patient informed consent obtained at the time of treatment?) :</p> <p>This research project was approved by the Ethics and Research Committee of Hospital das Clínicas, FMUSP. Online registration CAPPesq: 15226 approved 06/20/2016. Approved on the Brazil platform CAAE number: 61719416.6.0000.0068</p> <p>I understand that my co-authors and I will be asked to provide these forms upon request from the editorial office.</p> <p>I confirm my manuscript file conforms to the required format.</p> <p>I confirm that I will upload the Revision Checklist with my revision.</p> <p>AC</p> <p>No, there are no changes to authorship in my revision.</p> <p>Not Received</p> <p>9 of 11 forms complete - View Electronic Forms Status</p>
Copyright (Article)	
Specific Formatting	
Revision Checklist	
Previously Published	
Changes in Authorship	
Copyright Release Date	
Electronic Forms	<p>Nicollas Nunes Rabelo (Corr): Publication Agreement completed on 2021-05-25, Author conflict of interest disclosure form completed on 2021-05-25</p> <p>Antonio Carlos Samaia da Silva Coelho: Author conflict of interest disclosure form completed on 2021-05-18</p> <p>Joao Paulo Mota Telles: Author conflict of interest disclosure form completed on 2021-05-18</p> <p>Giselle Coelho: Author conflict of interest disclosure form completed on 2021-05-28</p> <p>Caio Santos de Souza: Not Completed</p> <p>Tania Regina Tozetto-Mendoza: Author conflict of interest disclosure form Not Completed</p> <p>Natan Pourzoni Galvani de Oliveira: Author conflict of interest disclosure form completed on 2021-05-18</p> <p>Paulo Henrique Braz-Silva: Author conflict of interest disclosure form completed on 2021-05-18</p> <p>Manoel Jacobson Teixeira: Author conflict of interest disclosure form completed on 2021-05-26</p> <p>Eberval Gadelha Figueiredo: Author conflict of interest disclosure form completed on 2021-05-26</p>
Manuscript Items	
	<p>1. Manuscript File PDF (294KB)</p> <p>Source File (DOCX) 129KB</p>

https://caselessons.msubmit.net/cgi-bin/main.plex?form_type=view_ms&j_id=830&ms_id=85440&ms_rev_no=2&ms_id_key=ftdFyut3QT14qFEKvctam6rA

1/2

07/06/2021

CASE21-301R2

2. Figure 1 - Computed tomography (CT) [PDF \(1162KB\)](#)
[Source File \(PDF\) 1162KB](#)
3. Checklist [PDF \(234KB\)](#)
[Source File \(PDF\) 234KB](#)
4. Figure 2 - Angio-Computed tomography (CT) angiography reconstruction and CT Scan in Axial View [PDF \(1084KB\)](#)
[Source File \(PDF\) 1084KB](#)
5. Figure 3 - Sample of intracranial aneurysm wall of Human Herpesvirus identification [PDF \(703KB\)](#)
[Source File \(PDF\) 703KB](#)
6. Table - 1 [PDF \(99KB\)](#)
[Source File \(DOCX\) 112KB](#)
7. "Revision Cover Letter" [PDF \(618KB\)](#)
[Source File \(DOCX\) 17KB](#)
8. Merged File containing manuscript text, 3 Figure files and 1 Table file. (Author Uploaded) [PDF \(881KB\)](#)

[Previous Decision Letter \(Blind reviews at bottom of letter\)](#)**More Manuscript Info and Tools**[Send Manuscript Correspondence](#)[Decision Summary](#)[Check Status](#)

[Manuscript Home](#) | [Author Instructions](#) | [Reviewer Instructions](#) | [Help](#) | [Logout](#) | [JNSPG Website](#)
Terms of Service Licensed under Patent #US 7,620,555B1

The official journal of the American Association of Neurological Surgeons.

07/06/2021

Email – Nicollas Rabelo – Outlook

CASE21-301R2 Acceptance letter from the Journal of Neurosurgery - Human Herpesvirus DNA Occurrence in Intracranial Aneurysmal Wall: Illustrative Case

jnscaselessons@msubmit.net <jnscaselessons@msubmit.net>

Seg, 07/06/2021 12:08

Para: nicollasrabelo@hotmail.com <nicollasrabelo@hotmail.com>

Cc: antonio.coelho@fm.usp.br <antonio.coelho@fm.usp.br>; joao.telles@fm.usp.br <joao.telles@fm.usp.br>; gigicoelho7@hotmail.com <gigicoelho7@hotmail.com>; caszx4@gmail.com <caszx4@gmail.com>; tozetto@usp.br <tozetto@usp.br>; samaiaantonio@gmail.com <samaiaantonio@gmail.com>; pbraz@usp.br <pbraz@usp.br>; manojacobsen@gmail.com <manojacobsen@gmail.com>; ebgadilha@yahoo.com <ebgadilha@yahoo.com>

June 7, 2021

Dr. Nicollas Nunes Rabelo
Universidade de Sao Paulo
Department of Neurosurgery
Av. Antonio Diederichsen, nº 190, Ap. 193, Jardim América
São Paulo, São Paulo 14.020-250
Brazil

Dear Dr. Rabelo:

We are pleased to inform you that your article entitled "**Human Herpesvirus DNA Occurrence in Intracranial Aneurysmal Wall: Illustrative Case**," submitted to Journal of Neurosurgery: Case Lessons, has been accepted for publication.

Editor-in-Chief's comments:

After careful review of your revised manuscript, I am satisfied that you have answered the Reviewers' comments. Accordingly, your manuscript will now be prepared for publication.

Congratulations to you and your co-authors!

Please note that changes to authorship, including changing the corresponding author, at this point will no longer be considered.

Our production staff will contact you when your manuscript enters the active phase of the editing and production process. Due to the numerous high-quality acceptances that we process, it may take some time before this next phase begins. We would appreciate your prompt response to all queries.

If any of your user account information changes, please log in to your account on our manuscript submission site and update it.

If you would like to check on the status of your paper, please email our production staff at: production@thejns.org.

Sincerely,

James T. Rutka, M.D., Ph.D.
Editor-in-Chief
Journal of Neurosurgery Publishing Group

Apêndice E

Trabalho submetido para publicação no JAMA Neurology. Torque Teno Virus (TTV). Infection as a potential factor in intracranial aneurysm pathogenesis.

07/06/2021

NEU21-1357

JAMA Network™

JAMA Neurology

[HOME](#)[AUTHOR INSTRUCTIONS](#)[REVIEWER INSTRUCTIONS](#)[LOGOUT](#)[JOURNAL HOME](#)

Detailed Status Information

Manuscript #	NEU21-1357
Current Revision #	0
Submission Date	06-04-2021 14:41
Current Stage	Under Review
Title	Torque Teno Virus (TTV) Infection as a Potential Factor in Intracranial Aneurysm Pathogenesis
Manuscript Type	Original Investigation
Study Type	Case-Control Study
Theme Issue	N/A
Corresponding Author	Nicollas Rabelo (University of São Paulo Medical School, São Paulo, SP, Brazil)
Coauthors	Nicollas Rabelo (corr_auth), Marcia Yoshikawa, Joao Telles, Giselle Coelho, Caio de Souza, Tania Mendoza, Paulo Braz-Silva, Antonio Boechat, Manoel Teixeira, Eberval Figueiredo
Visual Abstract Required?	
Abstract	<p>Background: Torque Teno Virus (TTV) is a recently discovered virus with high prevalence in the population worldwide. It promotes a lifelong viremia and is associated with many human-host infections. The aim of this study is to investigate the prevalence of TTV DNA in the walls of intracranial aneurysm (IA).</p> <p>Method: Samples of IA walls were collected after microsurgical clipping, a total of 35 IA ruptured (n=22), unruptured (n=13) patients. The samples were submitted to DNA extraction using the EasyMag automatized extractor and performed with Qiagen DNA extraction Minikit 250, extracted was submitted to PCR examination with primers for β-globin as internal control using the Nanodrop® 2000 spectrophotometer. A quantitative (real-time) PCR (qPCR) with TTV-specific - TaqMan Universal Master Mix (ThermoFisher®).</p> <p>Findings: A total of 35 cases, 22 (62.8%) ruptured and 13 (37.1%) unruptured aneurysms were obtained. TTV was detected in 15 (42.85%) cases, being 10 (45.4%) ruptured and 5 (38.4%) unruptured ($p=0.732$). Female represents most of the sample (n=29; 82.9%), including 18 (81.8%) ruptured cases and 4 (18.2%) unruptured ($p=0.352$). Multiple aneurysms corresponded</p>

https://manuscripts.jamanetwork.com/cgi-bin/main.plx?form_type=status_details&j_id=36&ms_id=40832&ms_rev_a=0&ms_id_key=3dAp0z9SLqgyRCPb2k... 1/2

07/06/2021

NEU21-1357

	14 (40%) of the sample ($p=0.4$). TTV and multiple aneurysms association were present in 5 cases (17,2%, $p=0.73$). The findings of the virus on the IA wall and the ruptured IA were not statistically significant ($p = 0.96$) Interpretation: This study presented the first description of TTV DNA in the IA wall. The prevalence was 42.85% in our sample. This finding suggests that infection may play a role in the pathophysiology of IA regarding the influence of the virus on the inflammatory process. New studies with larger samples are essential to determine the exact relationship between inflammation, viral infection, and formation and rupture of the IA.
Reviewing Editor	N/A
Subject Areas	Primary Subject Area: Neurosurgery/Neurosurgery Secondary Subject Areas: Cerebrovascular disease, stroke/Aneurysms
Conflicts of Interest	No, the author(s) have no potential conflicts of interest to disclose
Funding Organization(s) and Funding Support	No Funders

Stage	Start Date
Under Review	06-07-2021 15:10
In Quality Control	06-04-2021 14:41
Submission Pending	06-04-2021 11:33

[MANUSCRIPT HOME](#) | [AUTHOR INSTRUCTIONS](#) | [REVIEWER INSTRUCTIONS](#) | [HELP](#) | [LOGOUT](#) | [JOURNAL HOME](#)
[TERMS OF SERVICE](#) | [PRIVACY POLICY](#)
 EJPRESS Software by eJournalPress Licensed under Patent #US 7,620,555B1
 Copyright © 2021 American Medical Association. All Rights Reserved.