

MICHELLE PALMIERI

**Excreção oral de herpesvírus humanos e poliomavírus
em indivíduos imunocomprometidos**

São Paulo
2019

MICHELLE PALMIERI

**Excreção oral de herpesvírus humanos e poliomavírus
em indivíduos imunocomprometidos**

Versão Original

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

Área de concentração em Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Braz-Silva

São Paulo

2019

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

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

Palmieri, Michelle.

Excreção oral de herpesvírus humanos e poliomavírus em indivíduos imunocomprometidos / Michelle Palmieri; orientador Paulo Henrique Braz-Silva -- São Paulo, 2019.

138 p. : fig., tab. ; 30 cm.

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

Versão original

1. Herpesvírus humano. 2. Poliomavírus. 3. Carcinoma de células escamosas. 4. Radioterapia. 5. HIV. 6. Transplantados renais. I. Braz-Silva, Paulo Henrique. II. Título.

Palmieri M. Excreção oral de herpesvírus humanos e poliomavírus em indivíduos imunocomprometidos. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /

Banca Examinadora

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico esse trabalho a meus pais Zilá e Sidney, por sempre me incentivarem a fazer o meu melhor. Espero um dia poder retribuir tudo que vocês fizeram por mim.

Dedico também a meus irmãos Maurício e René, que assim com eu, seguem as sábias orientações e incentivos dos meus pais, de sempre tentar aprender algo mais, fazer o bem e nos tornar pessoas melhores.

Ao meu noivo Jonathan, para que sigamos juntos,...sempre,...superando os obstáculos e buscando sempre aumentar o nosso conhecimento.

Dedico também a minha prima Simone, minha cunhada Cristiane, aos meus amigos, que compreenderam a minha ausência, quando ela se fez necessária, para que esse trabalho pudesse ser concluído.

Dedico as minhas colegas Renata, Joanna e Gisela, da Especialização em Cirurgia Bucomaxilofacial da FFO-FOUSP que me apoiaram e me ajudaram nessa jornada. E ao Prof Dr. Waldyr A. Jorge, coordenador do curso de Especialização em Cirurgia Bucomaxilofacial da FFO-FOUSP, que me estimulou a iniciar meus estudos na mestrado e na sequência o Doutorado.

Dedico aos meus professores do departamento e da faculdade, que dividiram comigo seus conhecimentos, fazendo parte essencial da minha formação.

E Dedico aos meus colegas de pós-graduação, especialmente ao Dmitry Sarmiento, cuja parceria foi fundamental para a conclusão desse trabalho. E também a Mariana Bergamini e Catharina Simioni, que me ajudaram e apoiaram para que esse trabalho pudesse ser finalizado.

A todos vocês meu muito obrigado.

**“Quem faz a sua vida melhor e mais feliz,
Sempre merece o seu “muito obrigado”**

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador e meu querido amigo Prof. Dr. Paulo Henrique Braz-Silva que desde o início do mestrado e depois no doutorado, acreditou em mim, me incentivou e me orientou não só para que esse trabalho fosse realizado, mas para que eu me aperfeiçoasse nessa “arte” que é a Patologia.

Agradeço a Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, minha casa desde a graduação, especialização, mestrado e doutorado. Um lugar em que aprendi muito e que fiz grandes amizades, que levarei para toda a vida.

Agradeço aos professores do Programa de Pós-graduação em Patologia Oral e maxilofacial e Pacientes Especiais, pela dedicação e profissionalismo. Vocês foram fundamentais na minha formação.

Agradeço aos dentistas e auxiliares do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo – ICESP, principalmente na figura de sua coordenadora, Dra. Thaís Bianca Brandão, que colaboram grandemente para a realização deste trabalho.

Agradeço a todos os pacientes por aceitarem participar dessa pesquisa e fazerem com que esse trabalho fosse possível.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Virologia (LIM-52) do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – IMTSP, na figura da Profa. Laura Masami Sumita e Profa. Dra. Tania Regina Tozzeto, que foram fundamentais na realização da parte laboratorial do trabalho.

Agradeço ao meu colega Victor Adriano de Oliveira Martins pela grande ajuda na parte laboratorial do trabalho e ao meu colega de pós graduação Dmitry Sarmento, que me ajudou na confecção e conclusão desse trabalho

Agradeço à Profa. Dra. Luciana Corrêa pelas análises estatísticas desse trabalho. Agradeço a colaboração de todos que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse realizado

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para a realização do presente trabalho.

“Conheça todas as teorias
e domine todas as técnicas,
Mas ao tocar uma alma humana,
seja apenas outra alma humana.”

(Carls G Jung)

RESUMO

Palmieri M. Excreção oral de herpesvírus humanos e poliomavírus em indivíduos imunocomprometidos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019. Versão Original

Pacientes com comprometimento sistêmico, por tratamentos oncológicos ou por doenças crônicas, são mais susceptíveis às infecções oportunistas por fungos, bactérias e vírus, o que pode interferir no manejo clínico e na qualidade de vida desses indivíduos. O objetivo desse trabalho foi descrever um panorama de excreção oral de herpesvírus humanos e poliomavírus em 3 grupos de pacientes imunocomprometidos: pacientes sob radio/quimioterapia para neoplasias em região de cabeça e pescoço, pacientes HIV positivos, pacientes transplantados renais. No primeiro grupo avaliado, de pacientes sob radio/quimioterapia, a excreção oral dos herpesvírus humanos não é afetada pela presença de xerostomia (uma das principais complicações orais agudas do tratamento), uma vez que houve uma progressão em relação à excreção de herpesvírus, mesmo com a evolução da xerostomia, sugerindo uma replicação viral local na cavidade oral não sendo completamente dependente da excreção salivar. No segundo grupo avaliado, de pacientes HIV positivos, houve uma excreção oral infrequente e intermitente do HHV-8 sem associação com a viremia. No terceiro grupo avaliado, de pacientes transplantados renais, a excreção de herpesvírus ocorreu com mais frequência do que em indivíduos imunocompetentes, especialmente o HSV-1 e EBV. A excreção oral do poliomavírus BK foi mais frequentemente encontrada na saliva do que no sangue, especialmente naqueles recentemente transplantados. No contexto de imunocomprometimento, pudemos observar nos grupos estudados que a excreção oral de herpesvírus humanos e poliomavírus pode ser observada com maior frequência do que a viremia, evidenciando assim uma possível ferramenta adicional no acompanhamento desses pacientes.

Palavras-chave: Herpesvirus humanos. Poliomavírus. Carcinoma epidermoide. Radioterapia. HIV. Transplantados renais.

ABSTRACT

Palmieri M. Oral shedding of human herpesvirus and poliomavirus in immunocompromised individuals [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019. Versão Original

Patients with systemic impairment due to cancer treatments or chronic diseases are more susceptible to opportunistic infections by fungi, bacteria and viruses, which may interfere with the clinical management and quality of life of these individuals. The aim of this study was to describe a panorama of oral shedding of human herpesvirus and polyomavirus in 3 groups of immunocompromised patients: patients undergoing radio/chemotherapy for head and neck tumors, HIV-positive patients and renal transplant patients. In the first evaluated group, of patients on radio/chemotherapy, the oral shedding of human herpesvirus is unaffected by the presence of xerostomia (one of the main acute oral complications of the treatment), as there has been a progression towards herpesvirus shedding, even with xerostomia evolution, suggesting a local viral replication in the oral cavity, that is not completely dependent on salivary excretion. In the second evaluated group, of HIV-positive patients, there was an infrequent and intermittent oral shedding of HHV-8 without association with viremia. In the third evaluated group, of renal transplant patients, herpesvirus shedding occurred more frequently, when compared with immunocompetent individuals, especially for HSV-1 and EBV and the oral shedding of polyomavirus BK was more frequent in saliva than in blood, especially in newly transplanted patients. In the context of patient's immunocompromise status, we observed in the groups studied that oral shedding of human herpesvirus and polyomavirus may be observed more frequently than viremia, thus evidencing a possible additional tool in the follow-up of these patients.

Keywords: Human herpesvirus. Poliomavirus. Squamous cell carcinoma. Radiotherapy. HIV. Renal transplant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Graus de mucosite oral (OMS) e semanas de RT (Teste de Friedman, $P < 0,001$).....	51
Figura 3.2 - Graus de xerostomia (SRO) e semanas de RT (Teste de Friedman, $P < 0,001$).....	51
Figura 3.3 - Graus de xerostomia (SRO) e semanas de RT (Teste de Friedman, $P < 0,001$).....	52
Figura 3.4 - Graus de disgeusia (NCIC) e semanas de RT (Teste de Friedman, $P < 0,001$).....	52
Figura 4.1 - Graus de xerostomia e semanas de RT	71
Figura 4.2 - Frequência de excreção oral dos herpesvírus na triagem, durante a RT e na consulta de 1 mês de acompanhamento	71
Figura 4.3 - Frequência da excreção oral do EBV em relação aos graus de xerostomia observada na triagem e durante a RT	72
Figura 4.4 - Frequência da excreção oral do HHV-7 em relação aos graus de xerostomia observada na triagem e durante a RT	73
Figura 4.5 - Frequência da excreção oral do HSV-1 em relação aos graus de xerostomia observada na triagem e durante a RT	74
Figura 4.6 - Frequência da excreção oral do HHV-6 em relação aos graus de xerostomia observada na triagem e durante a RT	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1-	Classificação das complicações orais agudas	47
Tabela 3.2-	Características gerais dos pacientes.....	48
Tabela 3.3-	Análise do grau de mucosite oral no decorrer das semanas de RT	49
Tabela 3.4-	Análise do grau de xerostomia no decorrer das semanas de RT.....	49
Tabela 3.5-	do grau de disfagia no decorrer das semanas de RT	49
Tabela 3.6-	Análise do grau de disgeusia no decorrer das semanas de RT	50
Tabela 4.1-	Classificação da Xerostomia (Seminars in Radiation Oncology).....	68
Tabela 4.2-	Sequência de bases que caracterizam o DNA família <i>Herpesviridae</i> ..	68
Tabela 4.3-	Excreção oral dos herpesvírus EBV, HHV-7, HSV-1, e HHV-6 em cada paciente em relação à Triagem e em cada semana durante a radioterapia (RT).....	69
Tabela 5.1-	Características dos participantes e anticorpo para HHV-8 e detecção do DNA entre pacientes HIV positivos e HIV negativos em São Paulo, Brasil	87
Tabela 5.2-	Concordância Intra-ensaios para 6 amostras de soro obtidas de 123 patients pacientes em São Paulo, Brasil	88
Tabela 5.3-	Desempenho dos ensaios sorológicos para detecção salivar do DNA do HHV-8 excretados entre 91 homens (47 HIV soropositivos and 44 HIV soronegativos HSH)	88
Tabela 6.1-	Comparação entre excreção oral dos herpesvírus em pacientes transplantados renais e indivíduos imunocompetentes.....	105
Tabela 6.2-	Associação entre gênero e excreção oral dos herpesvírus em pacientes transplantados renais	106

Tabela 6.3-	Associação entre excreção oral dos herpesvírus e idade e meses pós transplante em pacientes transplantados renais.....	109
Tabela 7.1-	Detecção e prevalência do BKPyV nas amostras de sangue e saliva.	121
Tabela 7.2-	Relação entre excreção oral do BKPyV e tempo pós-transplante	123

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVC	Acidente vascular cerebral
BK	Polioma
BKPyV	Poliomavírus
CAPE	Centro de Atendimento a Pacientes Especiais
cel	células
cp	cópias
CMV	Citomegalovírus
DNA	ácido desoxirribonucleico
EBV	Vírus Epstein-Barr
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Gy	Gray
HAART	Terapia antirretroviral altamente ativa
HHV-6	Herpes Vírus Humano tipo 6
HHV-7	Herpes Vírus Humano tipo 7
HHV-8	Herpes Vírus Humano tipo 8
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSV-1	Herpes simples humano tipo 1
HSV-2	Herpes simples humano tipo 2
HSM	Homens que fazem sexo com Homens
IC	Intervalo de Confiança
ICESP	Instituto do Câncer do Estado de São Paulo - Octávio Frias de Oliveira
IFA	Ensaio de Imunofluorescência
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IMT - USP	Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo
J	Joules
Log ₁₀	logaritmo 10
mg	miligramas

min	minutos	
ml	mililitros	
m ²	metros quadrados	
mm ³	milímetros cúbicos	
nM	nanômetro	
NCIC	National Cancer Institute Common Toxicity Criteria	
OMS	Organização Mundial da Saúde	
PCR	Reação da polimerase em cadeia	
QT	quimioterapia	
RNA	ácido ribonucleico	
RPM	rotações por minuto	
RT	radioterapia	
s	segundos	
SK	Sarcoma de Káposi	
SNE	sonda naso-enteral	
SRO	Seminars in Radiation Oncology	
TNM	Tumor, Linfonodos, Metástases (Escala para Estadiamento de Tumores)	
USP	Universidade de São Paulo	
UTI	Unidade de terapia intensiva	
VPN	Valor Preditivo Negativo	
VPP	Valor Preditivo Positivo	VZV Varicela-zoster
W	Watts	
3D	Tridimensional	
3D-RT	Radioterapia Tridimensional	

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
μl	microlitros
μM	micrômetro
®	marca registrada
%	por cento
<	menor
≥	maior ou igual
=	igual
±	mais ou menos

PREFÁCIO

Esta tese contém 5 capítulos, que dissertam sobre o tema “Excreção oral de herpesvirus humanos e poliomavírus em indivíduos comprometidos”. Os Capítulos I e II avaliaram pacientes submetidos a tratamento radio/quimioterápico para Carcinoma epidermoide em região de cabeça e pescoço. O Capítulo III avaliou pacientes HIV positivos. E os Capítulos IV e V avaliaram pacientes transplantados renais. Cada Capítulo é uma tradução livre para o português do conteúdo de 5 artigos científicos construídos ao longo do Curso de Doutorado e publicados em periódicos internacionais indexados.

I: Palmieri M, Sarmento DSJ, Falcão AP, Martins VAO, Brandão TB, Moraes-Faria K, Ribeiro ACP, Hasséus B, Giglio D, Braz-Silva PH. **Frequency and Evolution of Acute Oral Complications in Patients Undergoing Radio-Chemotherapy Treatment for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.** Ear Nose Throat J. 2019 :1-7. doi: 10.1177/0145561319879245

II: Palmieri M, Ornaghi M, Martins VAO, Correa L, Brandao TB, Ribeiro ACP, Sumita LM, Tozetto-Mendoza TR, Pannuti CS, Braz-Silva PH. **Oral shedding of human herpesviruses in patients undergoing radiotherapy/chemotherapy for head and neck squamous cell carcinoma is not affected by xerostomia.** J Oral Microbiol. 2018 May 28;10(1):1476643. doi: 10.1080/20002297.2018.1476643. eCollection 2018.

III: Braz-Silva PH, Tozetto-Mendoza TR, Sumita LM, Freire W, Palmieri M, do Canto AM, Avelino-Silva VI, Gallottini M, Mayaud P, Pannuti CS. **Prospective study of human herpesvirus 8 oral shedding, viremia, and serological status among human immunodeficiency virus seropositive and seronegative individuals in Sao Paulo, Brazil.** J Oral Microbiol. 2017 Oct 15;9(1):1384287. doi: 10.1080/20002297.2017.1384287. eCollection 2017.

IV: de Santana Sarmento DJ, Tozetto-Mendoza TR, Masami Sumita L, Pierroti LC, Pallos D, Caliento R, Palmieri M, de Oliveira Martins VA, Gallottini M, Pannuti CS, Braz-Silva PH. **Oral shedding of human herpesviruses in renal transplant recipients.** Clin Oral Investig. 2018 Mar;22(2):885-891. doi: 10.1007/s00784-017-2166-3.

V: Sarmiento DJS, Palmieri M, Galvão GS, Tozetto-Mendoza TR, Canto CMD, Pierrotti LC, David-Neto E, Agena F, Gallottini M, Pannuti CS, Fink MCD, Braz-Silva PH. **BK virus salivary shedding and viremia in renal transplant recipients.** J Appl Oral Sci. 2019 Jan 14;27:e20180435. doi: 10.1590/1678-7757-2018-0435.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
2	PROPOSIÇÃO	31
3	CAPITULO I: FREQUÊNCIA E EVOLUÇÃO DAS COMPLICAÇÕES ORAIS AGUDAS EM PACIENTES SUBMETIDOS A RADIO/QUIMIOTERAPIA PARA TRATAMENTO DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE EME REGIÃO DE CABEÇA E PESCOÇO	33
3.1	Introdução	33
3.2	Pacientes e Métodos	35
3.3	Resultados	36
3.3.1	Mucosite Oral	37
3.3.2	Xerostomia	38
3.3.3	Disfagia	38
3.3.4	Disgeusia.....	38
3.4	Discussão	39
3.5	Conclusão	42
	Referência	43
4	CAPITULO II: EXCREÇÃO ORAL DOS HERPESVÍRUS HUMANOS EM PACIENTES SUBMETIDOS A RADIO/QUIMIOTERAPIA PARA TRATAMENTO DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE EME REGIÃO DE CABEÇA E PESCOÇO NÃO É AFETADA PELA XEROSTOMIA.	53
4.1	Introdução	53
4.2	Materiais e Métodos	54
4.3	Resultados	56
4.3.1	Xerostomia	57
4.3.2	Herpesvírus humanos	57
4.3.2.1	<i>Sorologia</i>	57
4.3.2.2	<i>Excreção Oral dos herpesvírus humanos</i>	58
4.3.2.3.	<i>Excreção Oral dos herpesvírus humanos e Xerostomia</i>	59

4.4	Discussão	60
4.5	Conclusão.....	63
	Referência.....	65
5	CAPITULO III: ESTUDO PROSPECTIVO DA EXCREÇÃO ORAL, VIREMIA E STATUS SOROLÓGICO DO HERPESVÍRUS HUMANO TIPO 8 EM PACIENTES HIV POSITIVOS E HIV NEGATIVOS EM SÃO PAULO, BRASIL.....	77
5.1	Introdução	77
5.2	Métodos	78
5.2.1	Participantes do estudo e coleta das amostras.....	78
5.2.2	Ensaio sorológicos	79
5.2.3	<i>Ensaio moleculares HHV-8</i>	<i>79</i>
5.2.3.1	<i>Extração de DNA</i>	<i>79</i>
5.2.3.2	<i>ORF 26 real time PCR</i>	<i>80</i>
5.2.4	Análise estatística	80
5.3	Resultados.....	80
5.4	Discussão	82
5.5	Conclusão.....	84
	Referência.....	85
6	CAPITULO IV: EXCREÇÃO ORAL DE HERPESVIRUS HUMANOS EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS	89
6.1	Introdução	89
6.2	Materiais e Métodos.....	91
6.3	Resultados.....	93
6.4	Discussão	93
6.5	Conclusão.....	99
	Referência.....	101
7	CAPITULO V: EXCREÇÃO ORAL E VIREMIA DOS POLIOMAVIRUS EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS	109
7.1	Introdução	109
7.2	Materiais e Métodos.....	110
7.2.1	Delineamento e Estudo Populacional	110
7.2.2	Extração e quantificação de DNA usando PCR <i>real-time</i>	111
7.2.3	Análise estatística	111

7.3	Resultados	112
7.4	Discussão	113
7.5	Conclusão	115
	Referência	117
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	121
	REFERÊNCIAS	123
	ANEXOS	127

1 INTRODUÇÃO

Pacientes com comprometimento sistêmico, por tratamentos oncológicos ou por doenças crônicas, são mais susceptíveis às infecções oportunistas por fungos, bactérias e vírus, o que pode interferir no manejo clínico e na qualidade de vida desses indivíduos.¹⁻⁹

Embora a sorologia seja uma técnica já descrita e amplamente utilizada para detecção viral, mais recentemente, a coleta salivar vem sendo reconhecida como um método não invasivo, com baixo custo e com grande potencial de diagnóstico e de detecção de patógenos humanos.⁶⁻¹¹ Portanto, o melhor conhecimento sobre a excreção oral dos diferentes tipos virais humanos pode potencialmente ajudar a determinar o risco de infecções em pacientes comprometidos sistemicamente.

A radioterapia (RT) é um tratamento antineoplásico capaz de proporcionar elevadas taxas de controle tumoral, no entanto apesar dos eficazes resultados, a RT para tratamento de tumores em região de cabeça e pescoço, é acompanhada por complicações orais agudas decorrentes do envolvimento de tecidos radiosensíveis localizados próximos ao tumor: mucosite, disfagia, xerostomia e disgeusia.^{1-5,9,11}

É amplamente relatado na literatura que pacientes irradiados apresentam algum grau de imunossupressão, e que dessa forma, a mucosa oral irradiada pode ser afetada por infecções bacterianas, fúngicas e virais, exacerbando as complicações orais da RT.⁵⁻⁶ A associação entre infecções por herpesvirus humanos (HSV-1, HSV-2, EBV, CMV, VZV, HHV-6, HHV-7 e HHV-8) e complicações orais da RT é pouco descritas na literatura e os resultados existentes são contraditórios.^{6-7,11}

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um retrovírus composto por duas cópias idênticas do RNA que causa infecções crônicas assintomáticas, com um longo período de latência clínica e replicação viral persistente, causando das respostas imunológicas mediadas pelas células T. Uma vez que o estágio de imunossupressão é estabelecido, aumenta-se o risco de infecções oportunistas por bactérias, vírus, fungos e parasitas, podendo aumentar gravemente a morbidade e mortalidade. As doenças neoplásicas, como o Sarcoma de Kaposi e os linfomas, emergem também como consequência do imunocomprometimento em estágios avançados da doença.¹²

O Herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8) é o agente do sarcoma de Kaposi e é frequentemente encontrado em pacientes HIV positivos.¹²⁻¹³ Amostras orais desses pacientes mostram altas taxas virais do HHV-8 comparado com outros fluídos, sugerindo uma importante transmissão oral desse vírus.¹³⁻¹⁹

O transplante renal é considerado o tratamento de melhor custo-benefício para a reabilitação de pacientes em estágios avançados de doença renal. O sucesso dos transplantes depende principalmente do controle dos processos de rejeição, que estão diretamente associados ao desenvolvimento eficiente de agentes imunossupressores. No entanto, esses agentes influenciam negativamente o equilíbrio entre replicação viral e resposta imune celular. Este desequilíbrio gera risco potencial de infecções primárias ou oportunistas em pacientes transplantados renais, o que aumenta a morbidade e mortalidade, levando em muitos casos a perda do enxerto.²⁰⁻²⁵

Infecções por herpesvírus humanos, especialmente o HSV, VZV CMV, tem alta incidência em transplantados renais, pois o tratamento com imunossupressores pode facilitar a reativação desse vírus.^{20-24,26} Essas infecções são mais comuns nos primeiros meses após o transplante, quando o paciente está no período de máxima imunossupressão.^{21-22,24} A prevenção e controle dessas infecções são fatores importantes no sucesso dos transplantes renais.²⁰⁻²⁶

O poliomavírus BK (BKPyV) é frequentemente reativado em pacientes transplantados renais, nos primeiros meses após o transplante, devido à condição de máxima imunossupressão.²⁷⁻²⁹ Infecções pelo BKPyV podem causar nefrites levando a disfunção e falência renal em 1 a 10% dos pacientes transplantados renais.^{25,30-31} Considerando que o BKPyV se mantém latente no tecido renal, o monitoramento regular dos pacientes é importante para prevenir a manifestação da doença clínica e uma possível perda do enxerto.^{21,25,27-31}

Esses fatores nos levaram a desenhar o estudo dessa tese em “3” capítulos cujo objetivo principal foi descrever um panorama de excreção oral dos herpesvirus humanos e poliomavírus em 3 grupos de pacientes imunocomprometidos.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral desse estudo foi descrever um panorama de excreção oral de diferentes vírus em 3 grupos de pacientes imunocomprometidos:

1. Pacientes sob radio/quimioterapia para carcinoma epidermoide em região de cabeça e pescoço;
2. Pacientes HIV positivos;
3. Pacientes transplantados renais.

Os objetivos específicos desse estudo foram:

I - Analisar e avaliar prospectivamente a frequência e evolução das complicações orais agudas durante a radio/quimioterapia em pacientes diagnosticados com carcinoma epidermoide em região da cabeça e pescoço.

II - Avaliar a excreção oral dos herpesvírus humanos: HSV-1 e 2 (herpes vírus simples 1 e 2), EBV (vírus Epstein-Barr), CMV (citomegalovírus), VZV (vírus varicela-zoster), HHV-6, HHV-7 e HHV-8 (herpesvírus humanos 6,7 e 8) e sua possível associação com a xerostomia em pacientes submetidos a RT associada a quimioterapia para tratamento de carcinoma epidermoide em região de cabeça e pescoço.

III - Avaliar prospectivamente a frequência da excreção salivar do HHV-8 comparando com o perfil sorológico e viremia em homens e mulheres HIV positivos e homens que fazem sexo com homens HIV negativos.

IVA – Descrever o perfil de excreção oral dos herpesvírus humanos em pacientes transplantados renais.

V – Verificar a presença do Poliomavírus BK (BKPyV) na saliva de pacientes transplantados renais e correlacionar com a viremia.

3 CAPITULO I: FREQUÊNCIA E EVOLUÇÃO DAS COMPLICAÇÕES ORAIS AGUDAS EM PACIENTES SUBMETIDOS A RADIO/QUIMIOTERAPIA PARA TRATAMENTO DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE EME REGIÃO DE CABEÇA E PESCOÇO.

3.1 Introdução

A radioterapia (RT) é uma modalidade antineoplásica bem conhecida para tratamento de tumores malignos em região de cabeça e pescoço. Este tratamento oncológico é capaz de proporcionar elevadas taxas de controle tumoral. No entanto, apesar de seus eficazes resultados, a RT é acompanhada de complicações orais agudas: mucosite, xerostomia, disfagia e disgeusia, decorrentes do envolvimento de tecidos radiosensíveis localizados próximo ao tumor.¹⁻⁴

A mucosite oral é uma complicação oral aguda descrita como uma reação inflamatória tóxica da mucosa oral causada por tratamento citorredutor induzido por radioterapia e/ou quimioterapia (QT).⁵⁻⁶ Os pacientes com mucosite podem apresentar edema, eritema e formação de úlcera e pseudomembrana, resultando em sintomas de ardência que podem progredir para dor intensa, causando comprometimento na alimentação e comunicação verbal.⁴⁻⁸ Mais de 95 % dos pacientes submetidos a rádio/quimioterapia em região da cabeça e pescoço desenvolve algum grau de mucosite oral.^{2,5,7} Em casos mais severos pode causar desidratação, perda de peso (15%), hospitalização (16%) e a modificação ou a descontinuação do tratamento oncológico devido à condição debilitada dos pacientes.^{5,8-11} A mucosite oral ocorre geralmente em pacientes na segunda semana de RT, sua severidade aumenta ao longo das semanas de RT, atingindo os graus mais severos na quinta e sexta semana de tratamento.^{4,5,9-13}

A xerostomia também é uma das principais complicações orais agudas causadas pela possível destruição do parênquima glandular, levando à insuficiente ou nenhuma secreção de saliva. A xerostomia pode também ser caracterizada pelo espessamento da saliva e alteração do pH, devido ao fato dos ácinos serosos serem os primeiros a sofrer alterações em resposta à RT.^{4, 12 -13} A

xerostomia provoca desconforto aos pacientes, tais como lábios secos, queimação da mucosa bucal, alterações na superfície da língua e comissura, difícil adaptação de próteses dentárias, alterações de paladar (disgeusia), e nos casos mais graves, interferir na mastigação, deglutição e fonação.^{4,12-15} A xerostomia é relatada por 100% dos pacientes submetidos a RT na região da cabeça e do pescoço, sendo comumente observada após a primeira semana de RT e tornar-se mais grave ao longo das semanas, atingindo seu pico na sexta semana.^{4,12-16}

A Disfagia é um distúrbio de deglutição em que, além de provocar desconforto, pode desencadear a desnutrição e desidratação do paciente. Aproximadamente 60% dos pacientes que recebem RT desenvolvem algum grau de disfagia, desses, 20% desenvolvem disfagia severa (grau 3 e 4).^{4,7,10} Esses graus mais severos também podem estar relacionados à grande extensão do tumor e à dor intensa. Na verdade, os pacientes nessa condição só conseguem ingerir alimentos líquidos ou não recebem alimentação por via oral, o que acaba comprometendo assim a ingestão nutricional e causando consequente perda de peso. Quando os pacientes não podem comer por via oral, alimentação naso-enteral ou gastrostomia são utilizadas.^{4,10,12,13,17}

Disgeusia é a distorção ou diminuição do sentido do paladar, que ocorre devido a lesões causadas pela RT ou pela quimioterapia, no epitélio oral, nas papilas gustativas e nas terminações nervosas. Está estimado que 50-75% dos pacientes submetidos a RT, podem desenvolver a disgeusia, e que ela é normalmente relatada no início da RT.^{4,12,13} A severidade da disgeusia pode afetar o apetite do paciente devido à redução da ingestão calórica, e assim, induzir a perda de peso o que afeta o estado nutricional do paciente.^{4,12,13,17}

O objetivo deste estudo foi analisar e avaliar prospectivamente a frequência e evolução das complicações orais agudas durante a radio/quimioterapia em pacientes diagnosticados com carcinoma epidermoide em região da cabeça e pescoço.

3.2 Pacientes e Métodos

Todos os procedimentos realizados neste estudo envolvendo participantes estavam de acordo com os padrões éticos do comitê de pesquisa institucional e/ou nacional e com a declaração de Helsinque de 1964 e suas posteriores alterações ou padrões éticos comparáveis. Este estudo foi aprovado de acordo com o protocolo número 910.924 (CAAE 37922114.9.0000.0065) pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Anexo A). O Termo de consentimento Livre e Esclarecido por escrito foi aplicado e assinados por todos os participantes deste estudo.

No presente estudo, foram analisadas as complicações orais de 20 pacientes atendidos no Serviço de Odontologia Oncológica do Instituto do Câncer do Estado São Paulo (ICESP - FMUSP). Os pacientes foram avaliados semanalmente durante a radio/quimioterapia para o tratamento de carcinoma epidermoide em região da cabeça e pescoço. A mucosite oral foi avaliada de acordo com critérios da OMS¹⁸, ao passo que a disfagia e disgeusia foram avaliadas de acordo com os critérios de *National Cancer Institute Common Toxicity Criteria (NCIC)*¹⁹ e a xerostomia foi avaliada de acordo com os parâmetros definidos pelo *Seminars in Radiation Oncology (SRO)*²⁰, conforme listado na tabela 3.1.

Todos os pacientes preencheram os critérios de elegibilidade do presente estudo. Diagnóstico de carcinoma epidermoide em região de cabeça e pescoço, com tumores visíveis na cavidade oral. Protocolo de tratamento utilizando radioterapia 3D com dose total de 60 Gy (fracionada em 30 frações de 2 Gy/dia), com sessões diárias, durante cinco dias consecutivos (segundas a sextas, com pausas nos fins de semana) durante 6 semanas. Associação com QT com cisplatina 100 mg/m² (em 3 ciclos a cada 21 dias, nos dias 1, 22 e 43) começando no primeiro dia de RT. Tratamento dental prévio à RT, para controlar as infecções orais (exodontias, raspagem periodontal e restaurações); orientação sobre higiene oral (escovação, fio dental, e quando possível, enxágue bucal com clorexidina 0,12%). Utilização de laser de baixa intensidade para prevenir e tratar a mucosite oral, segundo o protocolo estabelecido pelo Serviço de Odontologia Oncológica do Instituto do Câncer do Estado São Paulo (ICESP-FMUSP), para todos

os pacientes submetidos a RT, para tratamento de carcinoma epidermoide em região de cabeça e pescoço, com tumores visíveis em cavidade oral.

O protocolo de laserterapia de baixa intensidade estabelece que todos os pacientes recebam aplicações diárias profiláticas de laser de baixa intensidade, após cada sessão de RT, com início no primeiro dia de RT. Este protocolo consiste em aplicações de laser de baixa intensidade (Laser DMC gêmeo, São Carlos, Brasil), na dosagem de 10W/10J por ponto, por um período de 10 segundos, em diferentes locais da cavidade oral (lado direito e esquerdo da língua, lábio superior e inferior, palato mole (direito e esquerdo), assoalho bucal (direito e esquerdo) e ventre lingual). A partir do momento em que a primeira úlcera foi observada, os pacientes receberam a laserterapia curativa, também com laser de baixa intensidade (Laser DMC gêmeo, São Carlos, Brasil), na dosagem de 40W/60J por úlcera, pelo período de 1 minuto. Associada à laserterapia, foi fornecida orientação da higiene oral, e também o uso de saliva artificial e medicação analgésica quando necessário.^{13,16}

A história médica dos pacientes foi obtida a partir dos registros médicos com os seguintes dados: idade, sexo, localização do tumor e TNM. A avaliação clínica da mucosite oral, disfagia, xerostomia e disgeusia foi realizada pelo mesmo dentista, semanalmente, após as sessões de RT (durante as seis semanas de tratamento).

Os dados foram apresentados em frequências relativas e absolutas. Para a comparação das frequências dos graus de mucosite, xerostomia, disfagia e disgeusia, foi utilizado o Teste de Friedman, considerando as semanas de radioterapia. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS 17.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, EUA) e o nível de significância foi de 5% ($P < 0,05$).

3.3 Resultados

Inicialmente, avaliou-se 50 pacientes com proposta de tratamento com radio/quimioterapia para carcinoma epidermoide em região de cabeça e pescoço, sem tratamento cirúrgico prévio. Trinta pacientes foram excluídos deste estudo tipo coorte, seja por razões pessoais (9 recusaram-se a participar e 3 mudaram-se para outra cidade) ou por razões médicas (5 tiveram alterações no protocolo de RT antes de iniciar o tratamento, 4 tiveram alterações na protocolo de RT durante o tratamento

devido à toxicidade, 4 tiveram a RT suspensa devido à internação em UTI e 5 foram a óbito).

Vinte pacientes completaram as 30 sessões (seis semanas) de tratamento radioterápico, com uma dose total de 60 Gy. Esses pacientes preencheram os critérios elegíveis do nosso estudo e tiveram as complicações orais agudas avaliadas semanalmente durante o todo o tratamento de RT.

As características gerais e história médica desses pacientes foram apresentadas na tabela 3.2. Todas essas características também foram descritas em um trabalho anterior publicado pelo nosso grupo.^{13,16}

3.3.1 Mucosite Oral

A apresentação clínica da mucosite foi observada pela primeira vez na segunda semana de RT, quando 30% dos pacientes apresentaram algumas alterações, sendo 2/20 de grau 1 e 4/20 de grau 2 (Figura 3.1). O número de pacientes com mucosite aumentou ao longo do tratamento radioterápico e quarta semana, todos os pacientes (20/20) apresentaram algum grau de mucosite. Nesta semana, os primeiros casos de mucosite mais grave (grau 3) também foram observados em 10% (2/20) dos pacientes. A sexta semana foi realçada pelo elevado número de casos mais graves de mucosite, com 35% (7/20) sendo classificada como grau 3 ou 4. As lesões orais de mucosite pioraram ao longo das semanas de RT. Foi observado na transição da segunda para a terceira semana, o maior número de alterações, porém foi na sexta semana que se observou os casos mais severos (Tabela 3.3).

3.3.2 Xerostomia

Quinze por cento (3/20) dos pacientes apresentaram xerostomia na primeira semana de RT. Na quarta semana de RT, todos os pacientes (20/20) apresentaram algum grau de xerostomia (Figura 3.2). O primeiro paciente com xerostomia grau 3 foi observado na quinta semana de RT. Na sexta semana, semelhantemente a mucosite oral, foi observado o maior número de pacientes com graus mais severos de xerostomia com 20% (4/20) apresentando grau 3. Os pacientes progrediram negativamente ao longo das semanas de RT, e a transição da segunda para a terceira semana apresentou o maior número de alterações enquanto a sexta semana se apresentou com os casos mais severos (Tabela 3.4).

3.3.3 Disfagia

Cinquenta por cento (10/20) dos pacientes relataram disfagia na primeira semana de RT, com 25% apresentando grau 1 e 25% apresentando grau 3 (Figura 3.3). Foi somente na sexta semana de RT que todos os pacientes (20/20) apresentaram algum grau de disfagia, incluindo o único caso (1/20, 5%) de disfagia mais severa (grau 4). A disfagia apresentou o maior número de alterações na transição da segunda para a terceira semana, porém foi na sexta semana que se verificou os casos mais severos de disfagia (Tabela 3.5).

3.3.4 Disgeusia

A disgeusia foi observada pela primeira vez na segunda semana de RT, em que 40% dos casos eram grau 1 (Figura 3.4). A partir da terceira semana casos mais severos (grau 2) foram observados. Na quinta semana, todos os pacientes que puderam ser avaliados (13/13) relataram algum grau de disgeusia e o maior número de casos severos também foi observado neste período. Os graus

de disgeusia pioraram ao longo das semanas de RT. Na transição da primeira para a segunda semana apresentou-se o maior número de alterações, mas foi na transição da terceira para a quarta semana que se observou uma piora considerável na severidade da disgeusia relatada pelos pacientes (Tabela 3.6). É importante notar que esta variável envolveu a perda de dados durante as semanas de RT, devido ao fato de que muitos pacientes tiveram que receber a alimentação por via naso-enteral não recebendo dieta oral nesse período.

No geral, observou-se que a terceira semana de RT parece representar uma semana crítica para os pacientes, uma vez que um elevado número de alterações foi observado na transição da segunda para a terceira semana, independentemente do grau do tumor. A sexta semana, no entanto, apresentou os pacientes com graus mais severos.

3.4 Discussão

A radioterapia é um dos tratamentos mundialmente mais utilizados para combater o carcinoma epidermoide em região da cabeça e pescoço, principalmente devido à sua eficácia de controle tumoral. No entanto a RT está associada a complicações orais bem documentadas na literatura: mucosite, xerostomia, disfagia e disgeusia.^{1-4,13,17}

Em uma revisão sistemática de Trotti et al. (2003), verificou-se que a maior prevalência de mucosite (43%) foi observada em pacientes com radioterapia associada com quimioterapia, em comparação com os doentes tratados com radioterapia (34%) ou quimioterapia (22%).¹⁰ Diferentes autores relatam que a mucosite geralmente é observada pela primeira vez na segunda semana de RT.^{4,10,13-15} Resultados similares foram observados no nosso estudo, como 30% dos pacientes apresentaram mucosite induzida por radio/quimioterapia, na segunda semana de RT, em que 10% apresentaram mucosite grau 1 e 20% apresentaram mucosite grau 2. Um aumento em sua severidade, ao longo das semanas de RT, também foi descrito na literatura e de fato, os graus mais severos de mucosite (graus 3-4) foram observados nas últimas semanas de

tratamento, o que pode levar à descontinuação da RT ou mesmo à hospitalização.^{4,9-10,13,15,21} Esses dados também foram observados em nosso estudo, pois os primeiros casos de mucosite grau 3 (10%) foram observados na quarta semana e em um terço dos pacientes (35%) desenvolveu mucosite grau 3 e 4 na sexta semana.

A severidade da mucosite oral pode ser reduzida com o tratamento dentário prévio a RT (exodontias, raspagens e restaurações) e orientação de higiene oral (escovação, fio dental e bochechos com clorexidina 0,12%) que visam diminuir infecções por patógenos oportunistas que acabam por exacerbar a mucosite. É importante também realizar o monitoramento da mucosite ao longo de toda a RT com aplicações diárias de laser de baixa intensidade.^{4,8-9,12-14,22-26} Apesar dos graus mais severos de mucosite oral terem sido observados no presente estudo, não houve interrupção da rádio/quimioterapia no nosso grupo de pacientes, como resultado da sua severidade. Isso mostra que o controle da mucosite oral em graus aceitáveis foi possível devido ao tratamento odontológico prévio à RT e às aplicações diárias de laser de baixa intensidade durante as seis semanas de RT, mostrando a eficácia do protocolo proposto pelo ICESP.^{13,20}

A Xerostomia é uma complicação oral causada pela RT em região de cabeça e pescoço, com uma evolução que varia de acordo com o envolvimento das glândulas salivares no campo irradiado. Esta complicação pode ser descrita como transitória, quando os sintomas diminuem ou desaparecem após algumas semanas do término da RT, ou permanente, quando ocorre um dano irreversível no parênquima das glândulas salivares.^{4,12-13,15} Existe um consenso de que mudanças na taxa de fluxo salivar ocorrerão quando as glândulas salivares receberem dose maior que 50 Gy de radiação. Abaixo disso, as alterações podem ser transitórias e limitadas.¹⁵⁻¹⁶ Os primeiros graus de xerostomia são normalmente observados nas primeiras semana de RT.^{4,10,13,16,21,23-24.} Em nosso estudo, 15% dos pacientes apresentaram xerostomia na primeira semana e 45% na segunda semana de RT. Um agravamento da xerostomia ocorreu ao longo das semanas de RT, com todos os pacientes apresentando algum grau de xerostomia na quarta semana de RT. A sexta semana de RT, foi marcada pelo número elevado de casos mais severos de xerostomia, em que 20% foram classificados como grau 3, apesar disso, foi na transição da segunda para o terceira semana, que foi observado o maior número de alterações.

A maioria dos pacientes submetidos à RT em região da cabeça e pescoço possivelmente irá apresentar algum grau de disfagia durante o tratamento, e de acordo com a literatura, é na quarta semana de RT que os pacientes desenvolvem os graus mais severos de disfagia (grau ≥ 2).^{4,10,13,16,17,25} Em nosso estudo, 50% dos pacientes relataram disfagia na primeira semana de RT, sendo 25% com o grau 1 e 25% com o grau 3, quando se alimentavam por sonda naso-enteral. A literatura também relata que a gravidade da disfagia pode estar associada com a dose cumulativa de radiação,^{12,17,26-28} um achado confirmado pelo nosso estudo, uma vez que essa complicação foi se agravando ao longo das semanas de RT até a sexta semana de RT, momento em que todos os pacientes apresentaram algum grau de disfagia, incluindo o caso mais grave de disfagia grau 4. Apesar disso, foi na transição da segunda para a terceira semana que se observou o maior número de alterações.

A disgeusia é também uma complicação oral aguda que ocorre devido a danos ao epitélio oral ou papilas gustativas, como resultado da RT e/ou QT. A disgeusia é inicialmente relatada pelos pacientes na segunda semana de RT, paralelamente ao início da mucosite.^{4,12,13,17} Este estudo mostrou resultados semelhantes à aqueles relatados na literatura, com a disgeusia sendo observada pela primeira vez na segunda semana de RT em que 40% dos pacientes desenvolveram disgeusia grau 1. Semelhantemente à disfagia, a gravidade da disgeusia pode estar associada à dose cumulativa de radiação (2Gy/dia, com dose total de 30 Gy ou superior).^{12,26} Em nosso estudo, graus mais severos de disgeusia (grau 2) foram observados a partir da terceira semana de RT, e na quinta semana, todos os pacientes que puderam ser avaliados (13/13), relataram algum grau de disgeusia. Foi também na quinta semana que foi observado o maior número de casos severos. É importante lembrar que no nosso estudo, alguns pacientes não puderam ser avaliados para disgeusia (assim provocando uma perda de dados ao longo das semanas) pois eles faziam uso de sonda naso-enteral e não recebiam dieta por via oral. Considerando-se as alterações, na transição da primeira para a segunda semana, foi quando se observou um maior número de alterações, no entanto foi na transição da terceira para a quarta semana que verificado o maior agravamento dos graus presentes.

A severidade das complicações orais agudas pode ser influenciada pela dose, campo e forma de aplicação da radiação. Os sintomas de maneira geral melhoram de forma consistente e significativa após a última semana de RT. A maioria das complicações retorna aos níveis basais após 12 semanas de tratamento, com exceção da xerostomia. A mucosite e a disfagia apresentaram uma melhora significativa nos sintomas após 4-6 semanas do término da RT, enquanto a disgeusia teve sua melhora significativa após 4 semanas. Esses dados são importantes para orientar e informar o paciente quanto ao planejamento clínico do tratamento ao qual serão submetidos.²⁹

Uma das limitações deste estudo foi o número de pacientes excluídos devido a razões médicas. Cinco pacientes sofreram alterações de protocolo de RT antes de iniciar as sessões, pois eles foram submetidos à cirurgia, e a necessidade de RT seria avaliada após o pós-operatório. Quatro pacientes sofreram alterações no protocolo de RT durante o tratamento devido à piora nas condições clínicas gerais. Esses pacientes apresentavam-se muito debilitados, com acentuada perda de peso e desenvolvendo infecções. Quatro pacientes tiveram a RT suspensa devido a Internações na UTI, pelas mesmas razões anteriores, porém em quadros muito mais graves. Cinco pacientes foram a óbito por diferentes causas: AVC, idade avançada e tumores extensos que levaram a outras complicações graves. É importante ressaltar que todas as exclusões que ocorreram durante esse estudo não estavam associadas às complicações orais agudas da RT.

3.5 Conclusão

Pacientes submetidos a radio/quimioterapia são afetados por complicações orais agudas que podem levar a alterações na cavidade oral, afetando a qualidade de vida do paciente. Compreender o curso natural das complicações orais agudas é importante para informar os pacientes sobre a importância de manter uma saúde bucal adequada, buscando minimizar os sintomas das complicações. Desenvolver melhores estratégias para tratar esses sintomas pode ajudar a melhorar a qualidade de vida em pacientes submetidos a radio/quimioterapia para tratamento de tumores em região de cabeça e pescoço futuramente.

REFERÊNCIAS

1. Halperin EC, Perez CA, Brady LW. The Discipline of Radiation Oncology. Principles and Practice of Radiation Oncology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p. 4,6,10.
2. Bhide SA, Nutting CM. Advances in radiotherapy for head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2010;46:439-41.
3. Fang FM, Chien CY, Tsai WL, et al. Quality of life and survival outcome for patients with nasopharyngeal carcinoma receiving three-dimensional conformal radiotherapy vs. intensity-modulated radiotherapy-a longitudinal study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2008;72:356-64.
4. Mosel DD, Bauer RL, Lynch DP, Hwang ST. Oral Complications in treatment of cancer patients. *Oral Dis.* 2011;17:550-9.
5. Sonis ST, Elting LS, Keefe D, et al. Perspectives on Cancer Therapy-Induced Mucosal Injury- pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. *Cancer Supp.* 2004;100:1995-2025.
6. Sonis ST. The pathobiology of mucositis. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(4):277-84.
7. Andrews N, Griffiths C. Dental complications of head and neck radiotherapy: Part 1. *Aust Dent J.* 2001;46:88-94.
8. Chen Y-K, Hou H-A, Chow J-M, Chen Y-C, Hsueh P-R, Tien H-F. The impact of oral herpes simplex virus infection and candidiasis on chemotherapy-induced oral mucositis among patients with hematological malignancies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011;30:753-9.
9. Lalla RV, Sonis ST, Peterson DE. Management of Oral Mucositis in Patients with Cancer. *Dent Clin North Am.* 2008;52:1-17.
10. Trotti A, Bellm LA, Epstein JB, et al. Mucositis incidence, severity and associated outcomes in patients with head and neck cancer receiving radiotherapy with or without chemotherapy: a systematic literature review. *Radiother Oncol.* 2003;66:253–62.
11. Scully C, Epstein J, Sonis S. Oral mucositis: a challenging complication of radiotherapy, chemotherapy, and radiochemotherapy. Part 2: Diagnosis and management of mucositis. *Head Neck.* 2004;26:77-84.
12. Wong HM. Oral complications and management strategies for Patients Undergoing cancer therapy. *ScientificWorldJournal.* 2014;8:2014:581795.
13. Palmieri M, Martins VAO, Sumita LM, et al. Oral shedding of human herpesviruses in patients undergoing radiotherapy/chemotherapy treatment for head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Oral Investig.* 2017;21:2291-301.
14. Brandão TB, Morais-Faria K, Ribeiro ACP, et al. Locally advanced oral squamous cell carcinoma patients treated with photobiomodulation for prevention of oral

mucositis: retrospective outcomes and safety analyses. *Support Care Cancer*. 2018;26:2417-423.

15. Mossman K, Shattzman A, Chencharick J. Long term effects of radiotherapy on taste and salivary function in man. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1982;8:991-7.

16. Palmieri M, Ornaghi M, Martins VAO, et al. Oral shedding of human herpesviruses in patients undergoing radiotherapy/chemotherapy for head and neck squamous cell carcinoma is not affected by xerostomia. *J Oral Microbiol*. 2018;10:1476643.

17. van der Laan HP, Bijl HP, Steenbakkers RJ, et al. Acute symptoms during the course of head and neck radiotherapy or chemoradiation are strong predictors of late dysphagia. *Radiother Oncol*. 2015;115:56-62.

18. WHOQOL - The World Health Organization Quality of Life Assessment (WHOQOL): position paper from the World Health Organization. *Soc Sci Med*. 1995;41:1403-9.

19. Parulekar W, Mackenzie R, Bjarnason G, Jordan RC. Scoring oral mucositis. *Oral Oncol*. 1998;34:63-71.

20. Camphausen K. Seminars in Radiation Oncology. *Semin Radiat Oncol*. 2009 Jul;19:141

21. Radvansky LJ, Pace MB, Siddiqui A. Prevention and management of radiation-induced dermatitis, mucositis, and xerostomia. *Am J Health Syst Pharm*. 2013;70:1025-32.

22. Zanin T, Zanin F, Carvalhosa AA, et al. Use of 660-nm Diode Laser in Prevention and Treatment of Human Oral Mucositis Induced by Radiotherapy and Chemotherapy. *Photomed Laser Surg*. 2010;28:233-7.

23. Carneiro-Neto JN, de-Menezes JD, Moura LB, Mussacato EM, de-Andrade CR. Protocols for management of oral complications of chemotherapy and/or radiotherapy for oral cancer: Systematic review and meta-analysis current. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2017;22:e15-e23.

24. Carvalho PA, Jaguar GC, Pellizzon AC, Prado JD, Lopes RN, Alves FA. Evaluation of low-level laser therapy in the prevention and treatment of radiation-induced mucositis: a double-blind randomized study in head and neck cancer patients. *Oral Oncol*. 2011;47:1176-81.

25. Gouveia de Lima A, Villar RC, de Castro G Jr, et al. Oral Mucositis Prevention by Low-Laser Therapy in Head and Neck Cancer Patients Undergoing Concurrent Chemoradiotherapy: A phase III Randomized Study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012;82:270-5.

26. Zecha JA, Raber-Durlacher JE, Nair RG, et al. Low-level laser therapy/photobiomodulation in the management of side effects of chemoradiation therapy in head and neck cancer: part 2: proposed applications and treatment protocols. *Support Care Cancer*. 2016;24:2793-805.

27. Niedermeier W, Matthaeus C, Meyer C, Staar S, Muller RP, Schulze HJ. Radiation-induced hyposalivation and its treatment with oral pilocarpine. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;86:541-9.

28. Tolentino ES, Centurion BS, Ferreira LHC, Souza AP, Damante JH, Rubira-Bullen IRF. Oral adverse effects of head and neck radiotherapy: literature review and suggestion of a clinical oral care guideline for irradiated patients. *J Appl Oral Sci.* 2011;19:448-54.

29. Moroney LB, Helios J, Ward EC, et al. Patterns of dysphagia and acute toxicities in patients with head and neck cancer undergoing helical IMRT±concurrent chemotherapy. *Oral Oncol.* 2017;64:1-8.

Tabela 3.1 - Classificação das complicações orais agudas

Classificação da Mucosite Oral (OMS)				
Grau 0	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4
Nenhuma alteração	Eritema mucosa Sensibilidade	em Eritema e úlceras Mucosa dolorida o paciente consegue alimenta-se com alimentos sólidos	Eritema extenso e úlceras Dor o paciente alimenta-se somente com líquidos.	Muitas úlceras Muita dor o paciente não consegue se alimentar pela boca.
Classificação da Disfagia (NCIC)				
Grau 0	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4
Nenhuma alteração	Disfagia moderada com consumo de dieta regular	Disfagia presente consumo de dieta predominantemente pastosa, mole e líquida	Disfagia severa uso de Sonda Naso-Enteral(SNE), Hidratação Intravenosa ou hiperalimentação	Obstrução completa não é possível engolir saliva, ulcerações com sangramento induzido por traumas, abrasão ou perfuração.
Classificação da Xerostomia (SRO)				
Grau 0	Grau 1	Grau 2	Grau 3	
Nenhuma alteração	Discreta Secura, sem interferência nos hábitos alimentares	Secura em boca, requer líquido para engolir.	Secura em boca, alteração na dieta, interferência no sono, fala ou outras atividades.	
Classificação da of Disgeusia (NCIC)				
Grau 0	Grau 1	Grau 2		
Normal	Paladar discretamente alterado	Paladar fortemente alterado		

Fonte: O autor.

Tabela 3.2 - Características gerais dos pacientes

Número de pacientes	20
Homens	19 (95%)
Mulheres	1 (5%)
Idade (média)	54,4
Localização do Tumor	
Orofaringe e Palato Mole	6 (30%)
Orofaringe e Base de Língua	4 (20%)
Base de Língua	4 (20%)
Assoalho	2 (10%)
Orofaringe e Trígono retromolar	1 (5%)
Trígono retromolar	1 (5%)
Gengiva	1 (5%)
Mucosa Jugal	1 (5%)
Classificação Tumoral TNM	
T4N3M0	3 (15%)
T4N2M0	10 (50%)
T4N1M0	1 (5%)
T3N0M0	2 (10%)
T2N2M0	1 (5%)
T2N0M0	2 (10%)
T1N2M0	1 (5%)
T1N2M0	1 (5%)

Fonte: O autor.

Tabela 3.3 - Análise do grau de mucosite oral no decorrer das semanas de RT

Mucosite oral	Mean Rank	p⁽¹⁾
1ª semana	1.40	
2ª semana	1.98	
3ª semana	3.60	<0.001
4ª semana	4.47	
5ª semana	4.58	
6ª semana	4.97	

(1) Teste de Friedman.

Fonte: O autor.

Tabela 3.4 - Análise do grau de xerostomia no decorrer das semanas de RT

Xerostomia	Mean Rank	p⁽¹⁾
1ª semana	1.53	
2ª semana	2.40	
3ª semana	3.28	<0.001
4ª semana	4.15	
5ª semana	4.53	
6ª semana	5.13	

(1) Teste de Friedman.

Fonte: O autor.

Tabela 3.5 - Análise do grau de disfagia no decorrer das semanas de RT

Disfagia	Mean Rank	p⁽¹⁾
1ª semana	2.15	
2ª semana	2.48	
3ª semana	3.33	<0.001
4ª semana	4.08	
5ª semana	4.25	
6ª semana	4.72	

(1) Teste de Friedman.

Fonte: O autor.

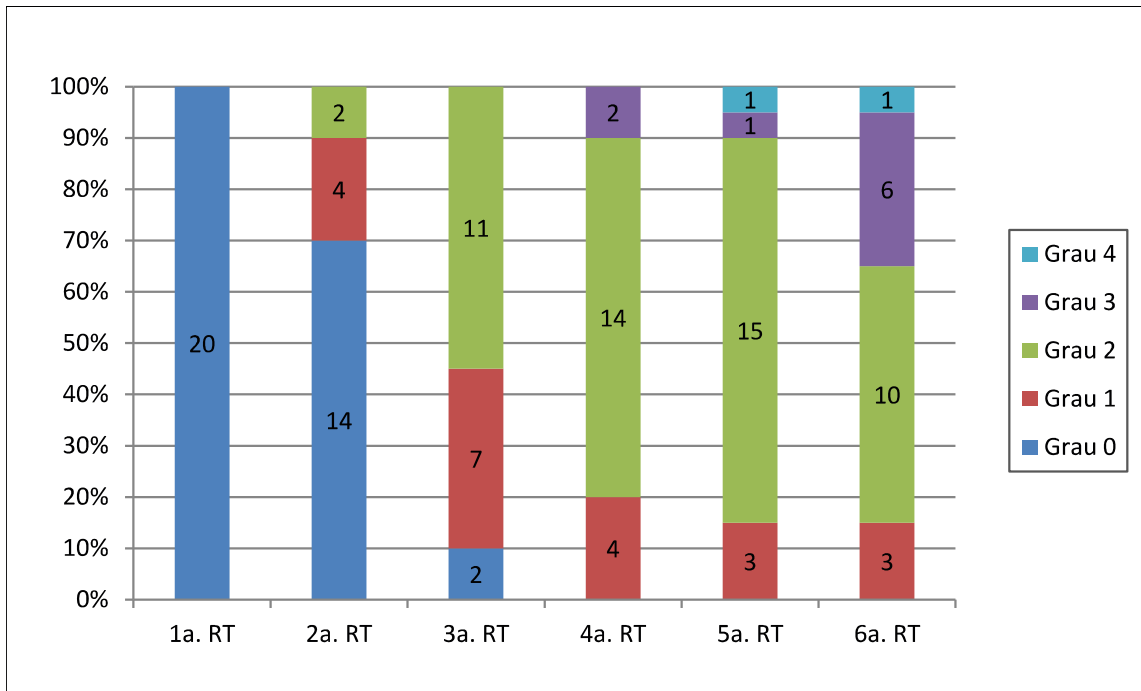
Tabela 3.6 - Análise do grau de disgeusia no decorrer das semanas de RT

Disgeusia	Mean Rank	p⁽¹⁾
1ª semana	1.59	
2ª semana	2.68	
3ª semana	2.91	
4ª semana	4.05	<0.001
5ª semana	5.00	
6ª semana	4.77	

(1) Teste de Friedman.

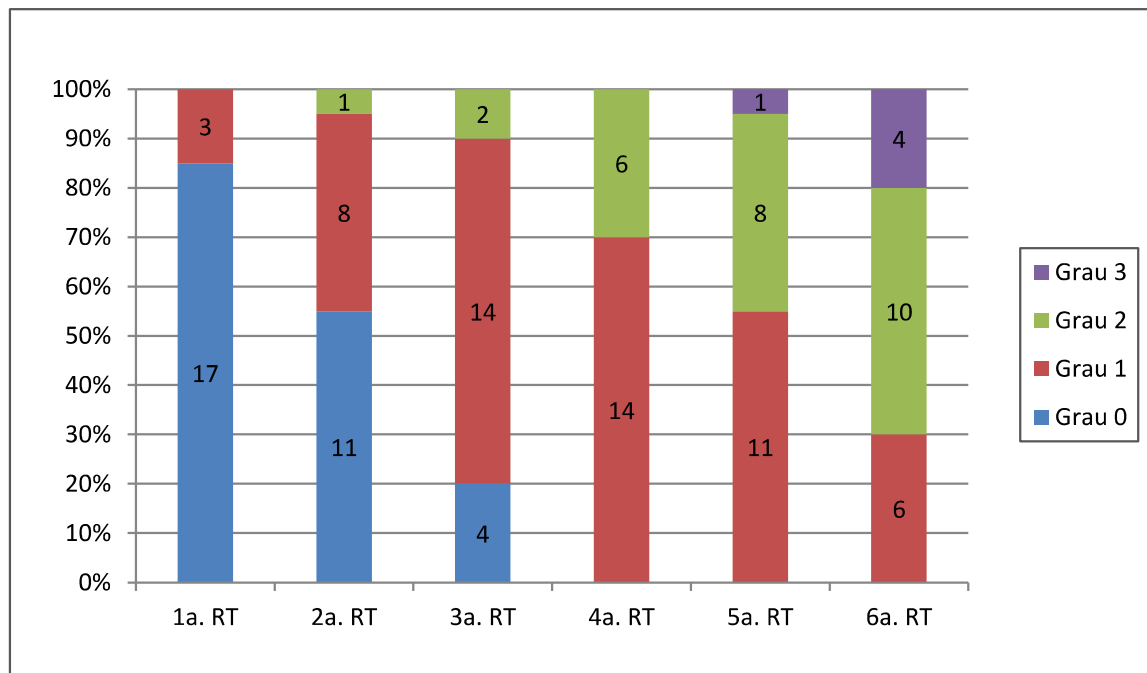
Fonte: O autor.

Figura 3.1 - Graus de mucosite oral (OMS) e semanas de RT (Teste de Friedman, $P < 0,001$)



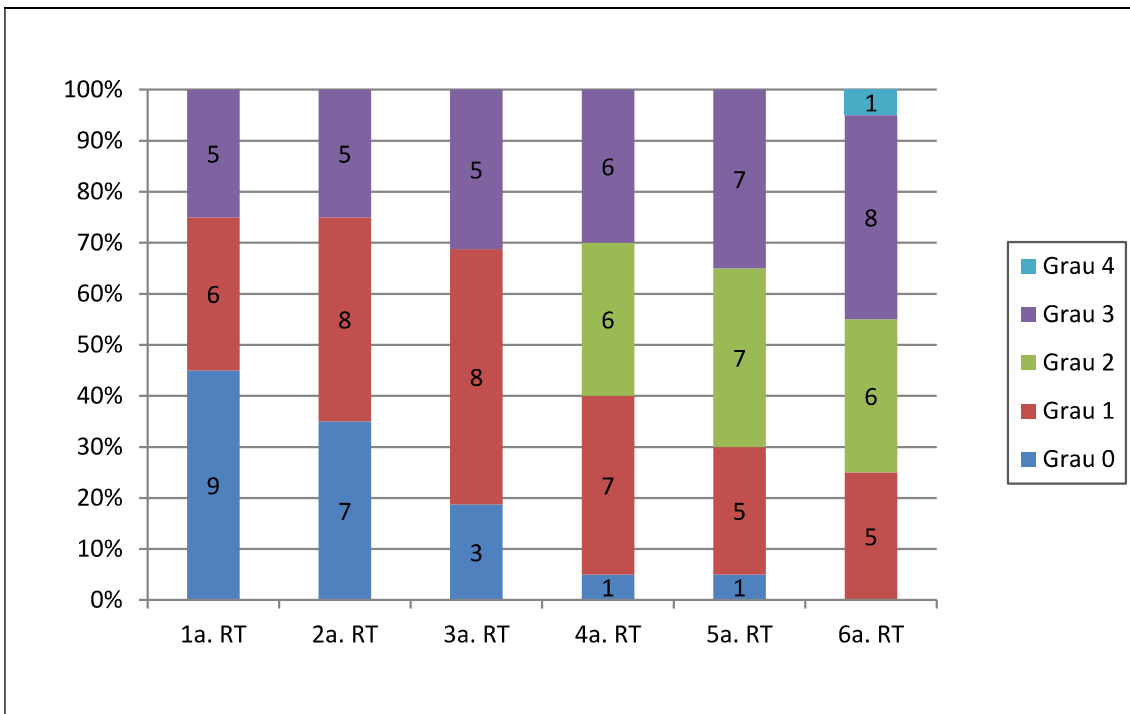
Fonte: O autor.

Figura 3.2 - Graus de xerostomia (SRO) e semanas de RT (Teste de Friedman, $P < 0,001$)



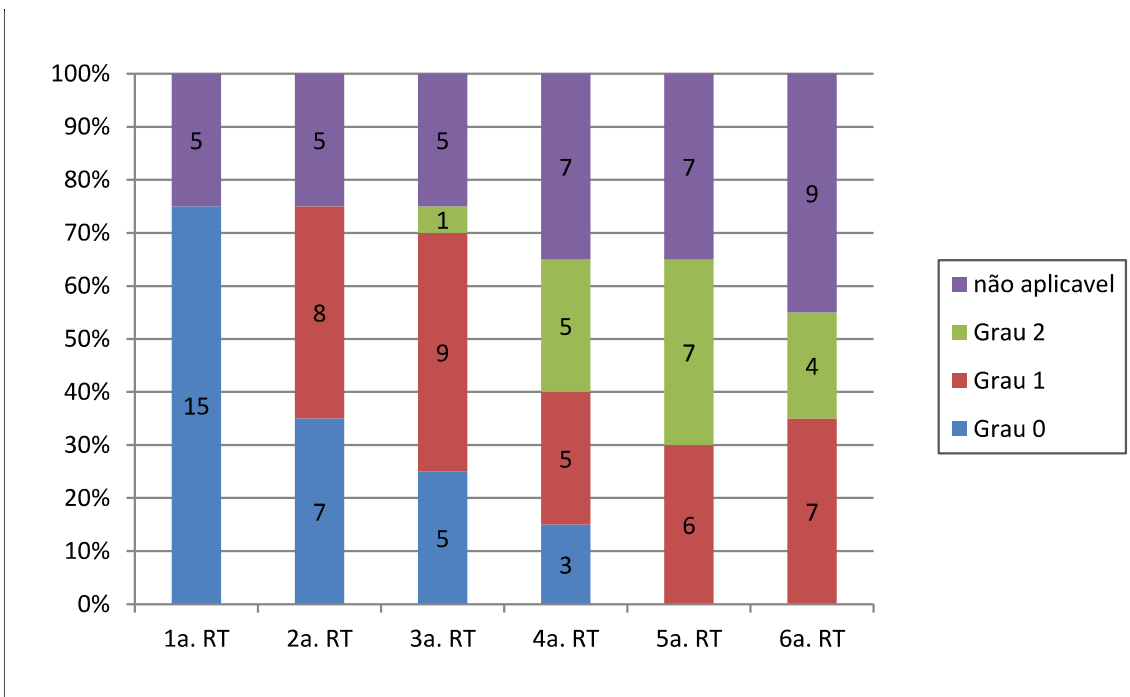
Fonte: O autor.

Figura 3.3 - Graus de disfagia (NCIC) e semanas de RT (Teste de Friedman, P < 0,001)



Fonte: O autor.

Figura 3.4 - Graus de disgeusia (NCIC) e semanas de RT (Teste de Friedman, P < 0,001)



Fonte: O autor.

4 CAPITULO II: EXCREÇÃO ORAL DOS HERPESVÍRUS HUMANOS EM PACIENTES SUBMETIDOS A RADIO/QUIMIOTERAPIA PARA TRATAMENTO DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE EME REGIÃO DE CABEÇA E PESCOÇO NÃO É AFETADA PELA XEROSTOMIA.

4.1 Introdução

A radioterapia (RT) é um tratamento antineoplásico capaz de fornecer altas taxas de controle do crescimento tumoral para os estágios 1 (80%) e estágios 2 (60% -70%), ao mesmo tempo que preserva estruturas anatômicas importantes.^{1,2} Apesar de sua eficácia, a RT para tratamento de tumores em região de cabeça e pescoço, é acompanhada por complicações decorrentes do envolvimento de tecidos radiosensíveis localizados próximos ao tumor.³⁻⁵

A xerostomia é uma complicação importante da RT, que é causada pela possível destruição do parênquima glandular, diminuindo assim a produção de saliva. A redução do fluxo salivar provoca desconforto aos pacientes, e nos casos mais graves, interfere com a mastigação, deglutição e fala. Sintomas clínicos como queimação da mucosa, lábios secos, fissuras nas comissuras, superfície da língua alterada, dificuldade de adaptação das próteses, bem como estomatite protética, são relatados por pacientes com xerostomia.⁶

Um estudo de Caielli et al. demonstrou que, em associação com a redução do fluxo salivar, a xerostomia também pode ser caracterizada por espessamento salivar e alteração de pH durante as semanas de tratamento radioterápico. De acordo com os autores, os ácinos serosos são os primeiros a sofrer alterações resultante da RT, seguida das membranas celulares e das células do ductais. Existe um consenso de que alterações no fluxo salivar acontecerão quando as glândulas salivares receberem mais de 50 Gy de radiação, e abaixo disso, essas alterações podem ser transitórias e limitadas.⁷ A xerostomia é comumente relatada pelos pacientes após a primeira semana de RT, e um aumento na sua gravidade é observado ao longo das semanas de tratamento.⁸ A sensação de boca seca pode prolongar-se por longos períodos após o término da RT.⁹

Descrito por diferentes autores, a mucosa oral irradiada pode ser afetada por infecções bacterianas, fúngicas e virais, exacerbando as complicações orais da RT.¹⁰⁻¹³ A associação entre infecções virais e as complicações orais da RT é pouco relatada na literatura e os resultados existentes são contraditórios. Alguns autores sugerem que a RT pode causar um estado transitório imunossupressão, contribuindo para a reativação dos herpesvírus humanos.¹⁴ Até o presente momento, existem poucos estudos relacionando a excreção oral dos herpesvírus humanos com a xerostomia, em pacientes submetidos a radioterapia associado à quimioterapia.¹⁵⁻¹⁷

O objetivo deste estudo foi avaliar a excreção oral dos herpesvírus humanos: HSV-1 e 2 (herpes vírus simples 1 e 2), EBV (vírus Epstein-Barr), CMV (citomegalovírus), VZV (vírus varicela-zoster), HHV-6, HHV-7 e HHV-8 (herpesvírus humanos 6,7,8), e sua possível associação com a xerostomia em pacientes submetidos a RT associada a quimioterapia para tratamento de carcinoma epidermoide em região de cabeça e pescoço.

4.2 Materiais e Métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, de acordo com o número de protocolo 910.924 (CAAE 37922114.9.0000.0065) (Anexo A).

Em nosso estudo, analisamos 158 amostras de lavado bucal coletados semanalmente de 20 pacientes admitidos na Divisão de Odontologia do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) para tratamento radioterápico para carcinoma epidermoide em região de cabeça e pescoço. Os pacientes selecionados se enquadravam nos critérios de inclusão desse estudo: diagnóstico de carcinoma epidermoide em região de cabeça e pescoço, protocolo de tratamento com radioterapia 3D (3D-RT) com dose total de 60 Gy associado à quimioterapia (QT) com cisplatina com dose de 100 mg/m², não ter realizado cirurgia para ressecção tumoral, tratamento odontológico previamente a RT, orientação de higiene bucal e terapia com laser de baixa potência durante a RT para prevenir e tratar a mucosite oral. A história médica de cada paciente foi obtida através de registros médicos, onde foram

coletados dados como: sexo, idade, localização do tumor e classificação TNM de tumores malignos.

O tratamento consistiu em RT-3D com dose total de 60 Gy, dividida em 30 frações diárias, por cinco dias consecutivos na semana, por um período de aproximadamente seis semanas. A QT foi realizada com cisplatina 100 mg/m² em três ciclos a cada 21 dias (dias 1 e 22 e 43), começando no primeiro dia de RT.

A avaliação clínica da xerostomia foi realizada pelo mesmo dentista, iniciando na triagem, depois durante as seis semanas RT (após cada sessão de RT) e na visita de acompanhamento (1 mês após o final da RT). A avaliação foi realizada de acordo com os critérios estabelecidos pelo Seminars of Radiation Oncology (Tabela 4.1).¹⁸

A sorologia para os herpesvírus humanos foi realizado no Laboratório de Virologia, Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMT – USP), usando kits ELISA (AbCam®, Cambridge, UK) para HSV-1, HSV-2, CMV, VZV e EBV, em três ocasiões diferentes: triagem, última sessão RT e sessão de acompanhamento 30 dias após o término da RT.

Amostras de lavado bucal foram coletadas dos pacientes, instruindo-os a fazer um bochecho com 5ml de água destilada por 30s. Após coletadas, as amostras foram armazenadas a -80°C. Simultaneamente às coletas, foi realizada avaliação da xerostomia, nos três momentos mencionados: triagem, seis semanas de RT e na visita de acompanhamento (1 mês pós RT).

A partir dessas amostras, de acordo com um trabalho anterior de nosso grupo^{13,19}, foi realizada, no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMT - USP), a extração de DNA utilizando um método semi-automático (sistema NucliSENS® easyMAG®, BioMérieux, Durham, NC). Em seguida, foi realizada a amplificação do DNA viral por meio da PCR (Reação da polimerase em cadeia) – PanHerpes, usando dois conjuntos de primers (HSVP1/P2 e VZVP1/P2) que correspondem a um alinhamento de sequências de DNA dos oito herpesvírus humanos descritos por Johnson et al.²⁰ (Tabela 4.2). O primeiro conjunto, HSVP1/P2, foi utilizado para amplificar HSV-1, HSV-2, EBV, CMV e HHV-8 e o segundo conjunto, VZVP1/P2, para amplificar VZV, HHV-6 e HHV-7. As amostras positivas foram submetidas à digestão enzimática, com enzimas de restrição BamHI e BstUI (New England Biolabs) para determinação de cada um dos oito herpesvírus, também descritos em um trabalho anterior de nosso grupo.^{13,19}

Todos os pacientes foram submetidos à laserterapia profilática (com laser de baixa potência) diariamente, após cada sessão de RT, começando no primeiro dia, como descrito anteriormente.¹³ Além da laserterapia, os pacientes foram orientados sobre a higiene bucal, uso de saliva artificial e medicação analgésica, se necessário.

Os resultados foram apresentados em frequências absolutas e relativas. Para comparação das frequências dos graus de xerostomia em relação às semanas de RT, foi usado o teste qui-quadrado. O teste de McNemar foi aplicado para análise pareada em relação ao tipo de vírus e as semanas de RT. Para comparar as frequências dos casos negativos de herpesvírus, incluindo o momento da triagem e o acompanhamento de um mês, utilizamos o teste Exato de Fisher. E para analisar se havia uma correlação entre presença/grau de xerostomia e a excreção oral dos diferentes herpesvírus humanos usamos o teste de Spearman. As análises estatísticas foram realizadas, utilizando o software Biostat 5.0® (Belém, Pará, Brasil) com nível de significância de 5%.

4.3 Resultados

Cinquenta pacientes diagnosticados com carcinoma epidermoide em região de cabeça e pescoço submetidos à RT associada à QT, foram avaliados. Apenas 25 pacientes (50%) iniciaram a RT, enquanto os outros foram excluídos por motivos diversos: mudança de cidade, pacientes que durante o tratamento não desejavam mais participar do estudo, alterações no protocolo de tratamento ou suspensão da RT e óbito. Cinco pacientes não completaram a RT, 3 por suspensão do tratamento devido à toxicidade e 2 que foram a óbito. Dessa forma, 20 pacientes efetivamente completaram a RT e preencheram os critérios de inclusão do nosso estudo. As características gerais desses pacientes foram: 19 homens e 1 mulher, com idade entre 39 e 72 anos (média = 54,4 anos). Os tumores estavam distribuídos da seguinte forma: 6 na orofaringe e palato mole, 4 na orofaringe e base da língua, 4 na base da língua, 2 no assoalho, 1 na orofaringe e trígono retromolar, 1 nas gengivas, 1 na mucosa jugal e 1 no trígono retromolar. Em relação à classificação TNM, foi observado: 3 pacientes classificados como T4N3M0, 10 como T4N2M0, 2 como T4N2M0, 1 como T3N0M0, 1 como T2N2M0, 2 como T2N0M0 e 1 como

T1N1M0. Todas essas características também foram descritas em um trabalho publicado anteriormente pelo nosso grupo.¹³

4.3.1 Xerostomia

Analisando as frequências de xerostomia observadas durante a RT e no acompanhamento de 1 mês pós RT, foi observada maior frequência de grau 1 de xerostomia (51,4%), o que foi estatisticamente diferente em comparação com o grau 2 (21%; teste qui-quadrado, $p < 0,001$) e grau 3 (3,6%, teste qui-quadrado, $p < 0,001$).

Na quarta semana de RT, todos os pacientes apresentavam algum grau de xerostomia, mas foi na sexta semana que os graus mais severos foram observados (Figura 4.1).

Considerando os graus de xerostomia que causam mudanças na dieta (graus 2 e 3), uma maior frequência destes graus de xerostomia foi observada nas últimas três semanas de RT (Figura 4.1) (teste do quadrado, $p < 0,001$).

Na visita de acompanhamento (1 mês após o término da RT), 10 pacientes (55%) apresentaram diminuição no grau xerostomia, mas sem remissão completa da mesma. Quinze pacientes (83,3%) apresentaram grau 1 e 3 pacientes (16,0%) apresentaram grau 2 de xerostomia (Figura 4.1).

4.3.2 Herpesvírus humanos

4.3.2.1 Sorologia

Ao analisar os anticorpos anti IgG desses pacientes, que corresponde ao contato anterior com vírus, foi possível observar que a totalidade de pacientes (20 pacientes) apresentaram IgG positivo para HSV1-HSV2, EBV e VZV em todos os três períodos de estudo: triagem, a última sessão de RT e a visita de 1 mês de

acompanhamento. Apenas um paciente era IgG negativo para CMV nos três períodos analisados.

Considerando a sorologia IgM, que corresponde ao contato viral recente ou possível reativação viral, um paciente apresentou IgM positivo para HSV1-HSV2 e outro IgM positivo para CMV em todos os três períodos de estudo. Um terceiro paciente apresentou IgM positivo para CMV no último período analisado, ou seja, 1 mês após o término da RT, indicando assim uma possível reativação do vírus.

4.3.2.2 *Excreção Oral dos herpesvírus humanos*

Ao analisar os resultados da excreção oral dos herpesvírus humanos na saliva, os resultados mostraram 18 pacientes (90%) com excreção oral do EBV, 14 pacientes (70%) do HHV-7, 7 pacientes (35%) do HSV-1 e 3 pacientes (15%) do HHV-6. Possíveis co-infecções também foram observadas, pois 15 pacientes (75%) apresentando excreção oral de dois ou mais herpesvírus. Quatro pacientes (20%) excretaram apenas EBV e 1 paciente (5%) apresentou resultados negativos para todos os herpesvírus. Ao analisar todos os pacientes, a frequência de excreção oral do EBV foi significativamente maior em comparação com outros herpesvírus (qui-quadrado teste, $p < 0,001$).

Considerando a excreção oral dos herpesvírus humanos nas semanas de RT, os resultados mostraram excreção oral de EBV, HHV-6 e HHV-7 em todas as semanas de RT (Figura 4.2). A excreção oral do HSV-1 não foi observada durante a triagem (Figura 4.2). A tabela 4.1, apresenta a excreção oral dos herpesvírus para cada paciente, durante cada período. A frequência de pacientes que tiveram excreção oral positiva de EBV aumentou principalmente a partir da segunda semana de RT, mas a diferença desta frequência em relação à triagem (antes de RT) não foi significativa (Teste de McNemar, $p = 0,070$). A excreção oral dos outros tipos de vírus, exibiu uma grande variação nas semanas de RT, porém sem diferença significativa em relação à triagem (Tabela 4.3). A análise das semanas de RT mostrou um aumento no número de pacientes com excreção oral de EBV (85%), na segunda semana (Figura 4.2). Não houve diferença estatisticamente significativa na frequência de excreção oral de EBV

observada nas primeiras três semanas e na frequência observada nas últimas três semanas de RT.

Durante a RT, amostras negativas para a excreção oral dos herpesvírus humanos foram observadas em todas as semanas de tratamento (Figura 2 e Tabela 4.3). No momento da triagem, um número maior de pacientes apresentou amostras negativas (7 pacientes, 35%), quando comparado com a consulta de acompanhamento (1 mês após a RT). Uma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre a frequência de casos negativos na triagem e na consulta de acompanhamento, pois houve uma diminuição no número de casos negativos nesse último momento. (Figura 4.2) (11%; teste Exato de Fisher, $p = 0,043$).

4.3.2.3 *Excreção oral de herpesvírus humanos e Xerostomia*

Uma análise da correlação entre xerostomia e frequência de excreção oral de diferentes herpesvírus foi realizada. Quanto ao EBV, não houve correlação significativa entre a frequência de xerostomia e a excreção oral do vírus, nem mesmo quando os graus mais severos de xerostomia (grau ≥ 2) foram considerados. A figura 4.3 apresenta a correlação entre a frequência de xerostomia e a excreção de EBV. Note-se que, na maioria dos casos, pacientes positivos e negativos para excreção oral de EBV exibiram xerostomia grau 1.

A análise das correlações entre excreção oral de HHV-7, HSV-1 e HHV-6 e presença/grau de xerostomia, não apresentou relação significativa. As figuras 4.4, 4.5 e 4.6 mostram a correlação entre a frequência da xerostomia e excreção dos herpesvírus. O número pequeno de casos em que HHV-7, HSV-1 e HHV-6 que foram excretados em associação com um determinado grau de xerostomia provavelmente não nos permite determinar qualquer correlação entre estas duas variáveis.

Ao analisar o grau de xerostomia e a presença de co-deteção de vírus, não encontramos correlação significativa entre a xerostomia grau ≥ 2 e presença de co-deteção de herpesvírus ao longo das semanas de RT.

4.4 **Discussão**

A RT utilizado como tratamento para carcinoma epidermoide em região de cabeça e do pescoço é amplamente conhecida, bem como suas complicações orais. Pacientes submetidos a RT podem desenvolver disfagia, xerostomia, disgeusia, mucosite e infecções oportunistas (bacterianas, fúngicas e virais) durante o tratamento.^{12,21-23}

Diferentes autores relatam uma variedade de complicações resultantes da RT. Entre elas, uma revisão sistemática por Trotti et al. mostrou que a xerostomia foi frequentemente encontrada.²⁴ No estudo de Cardoso et al. os autores observaram que 100% dos os pacientes irradiados com doses superiores ou iguais a 60 Gy apresentaram xerostomia,²⁵ dados que corroboram com o nosso estudo, uma vez que todos os pacientes apresentaram algum grau de xerostomia. Segundo estudos de Mosel et al. e Trotti et al. a sensação de boca seca é geralmente observada na terceira ou quarta sessão de RT devido à menor secreção de saliva pelas glândulas envolvidas no campo de radiação.^{12,24} Esta sensação de boca seca prejudica muito a qualidade de vida dos pacientes, interferindo não só na mastigação e deglutição, mas também na fonação, o que limita o convívio social. Em nosso estudo, observamos os primeiro relatos de xerostomia na primeira semana de RT, onde 3 pacientes (15%) apresentaram grau de xerostomia 1. Os autores também relataram que a xerostomia pode ser transitória ou permanente, dependendo do campo irradiado.^{12,24-25} Em nosso estudo, apesar do curto período de acompanhamento pós RT, 100% dos pacientes ainda apresentavam algum grau de xerostomia na visita de acompanhamento, ou seja, um mês após o término da RT. Além disso, todos os pacientes apresentaram algum grau de xerostomia na quarta semana de RT, o que persistiu até a visita de acompanhamento, significando um possível dano permanente ao parênquima das glândulas salivares.

Segundo estudos de Nicolatou-Galitis et al.²⁶ e Correia et al.¹⁷ a grande dificuldade em comparar estudos da xerostomia induzida por RT em região de cabeça e pescoço e sua possível correlação com o HSV-1, é a falta de padronização das amostras. Isso pode acontecer devido à inclusão de diferentes tipos de tumores, pacientes com diferentes protocolos tratamento radioterápico e /ou quimioterápico, coleta de amostras de lavado bucal coletadas em momentos distintos, e falta de dados sorológicos.^{16,17,26}

No presente estudo, todos os pacientes incluídos foram diagnosticados com carcinoma epidermoide em região de cabeça e pescoço e cujo protocolo de tratamento foi a RT, com dose total de 60 Gy, associada à QT (Cisplatina 100 mg/m²). Os pacientes também haviam sido submetidos à tratamento odontológico antes de iniciar RT e QT. Todos os pacientes foram tratados com laserterapia profilática e curativa para mucosite oral. O fator diferencial do nosso trabalho foi a coleta semanal de amostras de lavado bucal durante todo o período de RT, possibilitando assim estabelecer um perfil de excreção salivar dos herpesvírus ao longo do período estudado.

Nossos resultados mostraram que 5 pacientes (25%) foram positivos para o HSV-1 ao longo do RT e 2 pacientes (10%) na consulta de acompanhamento (1 mês após a RT), com uma taxa de excreção de 35%. Do total de pacientes acompanhados, nenhum deles apresentou amostra positiva para o HSV-1 antes do início da RT. No entanto, não houve correlação entre a excreção oral do HSV-1 e o início ou agravamento da xerostomia, bem como também não houve correlação com as semanas de RT. Uma possível hipótese para essa falta de correlação com os graus de xerostomia pode ser o controle da excreção oral do HSV-1 pela aplicação de laser de baixa intensidade, com resultados semelhantes aos de controle das lesões do herpes labial.²⁷⁻³³

Sabe-se que os herpesvírus HHV-6 e HHV-7 podem ser detectados em indivíduos saudáveis assintomáticos³⁴ considerando que o exantema subitum pode ser causado por infecção primária pelo HHV-6 e, menos frequentemente, pelo HHV-7.^{35,36} A taxa de excreção oral do HHV-6 na população saudável é baixa (ou seja, cerca de 10%), enquanto as taxas de excreção oral do HHV-7 podem variar de 12,6% a 90% dependendo do grupo populacional.^{34,37} O HHV-6 e HHV-7 podem ser observados não somente em pacientes saudáveis, mas também em imunocomprometidos. Um estudo de Pinheiro et al. avaliou a descamação oral em crianças soropositiva para HIV, relatando que 68% deles apresentaram HHV-6 na cavidade oral enquanto e 18% apresentaram HHV-7 na cavidade oral.³⁶ A excreção oral de HHV-6 parece ser maior e contínua em crianças em comparação com adultos.³⁸ Em nosso estudo, o HHV-7 foi o herpesvírus com a segunda maior frequência de excreção oral, respondendo por 70% das amostras positivas ($p = 0,001$), enquanto o HHV-6 representou 15% da frequência. Não houve diferença

estatística entre a excreção do HHV-6 e o HSV-1, bem como nenhuma correlação entre esses vírus e os graus de xerostomia ou as semanas de RT.

Em nosso estudo, o EBV foi o vírus com maior frequência de excreção durante o período do estudo, com 90% dos pacientes apresentando amostra positiva. Foi também observada diferença estatisticamente significativa da excreção do EBV, em relação a todos outros vírus excretados ($p < 0,001$). Ambinder et al.³⁹ e Van der Beek et al.¹⁴ afirmaram que 25% a 98% das amostras de saliva de pacientes imunossuprimidos foram positivas para EBV, como resultado da quimioterapia.^{14,39} Segundo os autores, todos os pacientes com câncer apresentam algum grau de imunossupressão, o que pode explicar as taxas mais altas de excreção de EBV. É também amplamente relatado na literatura, que pacientes oncológicos apresentam imunossupressão em diferentes graus, o que pode explicar as taxas mais altas de excreção oral do EBV, como observado anteriormente em outros grupos imunossuprimidos por diferentes razões.^{19,40}

Em outro estudo de Pasoto et al. os autores analisaram o soro de 100 pacientes com síndrome de Sjögren, uma doença autoimune crônica que afeta glândulas exócrinas (salivares e lacrimais) e que leva a xerostomia e ceratite sicca. Como resultado, eles puderam avaliar que a frequência de anticorpos EBV em pacientes de Sjögren, foi maior em comparação com os indivíduos saudáveis. Os autores concluíram que o vírus EBV nas glândulas salivares, em sua forma latente, poderia ocasionalmente retornar a sua forma de replicação e tornar-se sub-clinicamente reativado, sugerindo que o EBV poderia ser um potencial candidato etiológico para desencadeando de doenças autoimunes.⁴¹

Em nosso estudo, procuramos avaliar se a diminuição da excreção salivar levaria à uma diminuição da excreção oral de herpesvírus humanos na cavidade oral. Nossos resultados mostraram que a xerostomia causada pela RT não afeta a excreção dos herpesvírus humanos, uma vez que foi possível observar um aumento na excreção oral destes herpesvírus na cavidade oral, mesmo nas semanas em que a xerostomia era mais grave. Uma hipótese para este fato é de que a RT pode ter causado alteração no microambiente inflamatório da mucosa oral, favorecendo uma possível replicação local de herpesvírus na cavidade oral, aumentando assim o a presença deles nesta região.

4.5 Conclusão

Em conclusão, a excreção oral dos herpesvirus humanos não é afetada pela presença de xerostomia, uma vez que houve uma progressão em relação à excreção de herpesvírus, mesmo com a evolução da xerostomia, sugerindo uma replicação viral local na cavidade oral não sendo completamente dependente da excreção salivar.

REFERÊNCIAS

1. Halperin EC, Perez CA, Brady LW. The Discipline of Radiation Oncology. Principles and Practice of Radiation Oncology. Philadelphia (PA): Lippincott Williams & Wilkins; 2004 e.4,6,10
2. Bhide SA, Nutting CM. Advances in radiotherapy for head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2010;46:439-41.
3. Johansson J, Blomquist E, Montelius A, et al. Potential outcomes of modalities and techniques in radiotherapy for patients with hypopharyngeal carcinoma. *Radiother Oncol.* 2004;72:129-38.
4. Fang FM, Chien CY, Tsai WL, et al. Quality of life and survival outcome for patients with nasopharyngeal carcinoma receiving three-dimensional conformal radiotherapy vs. intensity-modulated radiotherapy-a longitudinal study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2008;72:356-64.
5. Parvathaneni U, Laramore GE, Liao JJ. Technical advances and pitfalls in head and neck radiotherapy. *J Oncol.* 2012; 2012;2012:597467.
6. Van der Laan HP, Bijl HP, Steenbakkers RJ, van der Schaaf A, et al. Acute symptoms during the course of head and neck radiotherapy or chemoradiation are strong predictors of late dysphagia. *Radiother Oncol.* 2015;115:56-62.
7. Radvansky LJ, Pace MB, Siddiqui A. Prevention and management of radiation-induced dermatitis, mucositis, and xerostomia. *Am J Health Syst Pharm.* 2013;70:1025-32.
8. Mossman K, Shattzman A, Chencharick J. Long term effects of radiotherapy on taste and salivary function in man. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1982;8:991-7.
9. Niedermeier W, Matthaeus C, Meyer C, et al. Radiation-induced hyposalivation and its treatment with oral pilocarpine. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;86:541-9.
10. Melkos AB, Massenkeil G, Arnold R, et al. Dental treatment prior to stem cell transplantation and its influence on the post transplantation outcome. *Clin Oral Investig.* 2003;7:113-5.
11. Lalla RV, Sonis ST, Peterson DE. Management of oral mucositis in patients with Cancer. *Dent Clin North Am.* 2008;52:1-17
12. Mosel DD, Bauer RL, Lynch DP, et al. Oral Complications in treatment of cancer patients. *Oral Diseases.* 2011;17:550-9.
13. Palmieri M, Martins VA, Sumita LM, et al. Oral shedding of human herpesviruses in patients undergoing radiotherapy/chemotherapy treatment for head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Oral Investig.* 2017;21:2291–301.

14. Van der Beek MT, Laheij AM, Raber-Durlacher JE, et al. Viral loads and antiviral resistance of herpesviruses and oral ulcerations in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* 2012;47:1222-8.
15. Redding SW, Luce EB, Boren MW. Oral herpes simplex virus infection in patients receiving head and neck radiation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1990;69:578-80.
16. Nicolatou-Galitis O, Athanassiadou P, Kouloulis V, et al. Herpes simplex virus-1 (HSV-1) infection in radiation-induced oral mucositis. *Support Care Cancer.* 2006;14:753-62.
17. Correia AVL, Coelho MRCD, de Oliveira Mendes Cahú, et al. Seroprevalence of HSV1-2 and correlation with aggravation of oral mucositis in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck region submitted to antineoplastic treatment. *Support Care Cancer.* 2015;23:2105-2111.
18. Camphausen K. *Seminars in Radiation Oncology.* Semin Radiat Oncol. 2009;19:141
19. de Santana Sarmiento DJ, Tozetto-Mendoza TR, Masami Sumita L, et al. Oral shedding of human herpesviruses in renal transplant patients. *Clin Oral Investig.* 2018;22:885-891.
20. Johnson G, Nelson S, Petric M, et al. Comprehensive PCR-Based Assay for Detection and Species Identification of Human Herpesviruses. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3274-9.
21. Andrews N, Griffiths C. Dental complications of head and neck radiotherapy: Part 1. *Aust Dent J.* 2001;46:88-94.
22. Sonis ST, Elting LS, Keefe D, et al. Perspectives on Cancer Therapy-Induced Mucosal Injury- pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. *Cancer Supp.* 2004;100:1995-2025
23. Scully C, Epstein J, Sonis S. Oral mucositis: a challenging complication of radiotherapy, chemotherapy, and radiochemotherapy. Part 2: Diagnosis and management of mucositis. *Head & Neck.* 2004;26:77-84.
24. Trotti A, Bellm LA, Epstein JB, et al. Mucositis incidence, severity and associated outcomes in patients with head and neck cancer receiving radiotherapy with or without chemotherapy: a systematic literature review. *Radiother Oncol.* 2003;66:253–62.
25. Carneiro-Neto JN, de-Menezes JD, Moura LB, et al. Protocols for management of oral complications of chemotherapy and/or radiotherapy for oral cancer: Systematic review and meta-analysis current. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2017;22:e15-e23.
26. Nicolatou-Galitis O, Dardoufas K, Markoulatos P, et al. Oral pseudomembranous candidiasis, herpes simplex virus-1 infection, and oral mucositis in head and neck cancer patients receiving radiotherapy and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) mouthwash. *J Oral Pathol Med.* 2001;30:471-80.
27. Carvalho RR, de Paula Eduardo F, Ramalho KM, et al. Effect of laser phototherapy on recurring herpes labialis prevention: an in vivo study. *Lasers Med Sci.* 2010;25:397-402.

28. Bello-Silva MS, de Freitas PM, Aranha AC, et al. Low- and high-intensity lasers in the treatment of herpes simplex virus 1 infection. *Photomed Laser Surg.* 2010;28:135-9.
29. Eduardo CdeP, Bezinelli LM, Eduardo FdeP, et al. Prevention of recurrent herpes labialis outbreaks through low-intensity laser therapy: a clinical protocol with 3-year follow-up. *Lasers Med Sci.* 2012;27(5):1077-83.
30. Muñoz Sanchez PJ, Capote Femenías JL, Díaz Tejada A, et al. The effect of 670-nm low laser therapy on herpes simplex type 1. *Photomed Laser Surg.* 2012;30:37-40.
31. de Paula Eduardo C, Aranha AC, Simões A, et al. Laser treatment of recurrent herpeslabialis: a literature review. *Lasers Med Sci.* 2014;29:1517-29.
32. Dougal G, Lee SY. Evaluation of the efficacy of low-level light therapy using 1072 nm infrared light for the treatment of herpes simplex labialis. *Clin Exp Dermatol.* 2003;38:713-8
33. Stona P, da Silva Viana E, Dos Santos Pires L, et al. Recurrent Labial Herpes Simplex in Pediatric Dentistry: Low-level Laser Therapy as a Treatment Option. *Int J Clin Pediatr Dent.* 2014;7:140-3.
34. Biganzoli P, Ferreyra L, Sicilia P, et al. IgG subclasses and DNA detection of HHV-6 and HHV-7 in healthy individuals. *J Med Virol.* 2010;82:1679-83.
35. Ward KN. The natural history and laboratory diagnosis of human herpesviruses-6 and -7 infections in the immunocompetent. *J Clin Virol.* 2005;32:183–93.
36. Pinheiro RS, Ferreira DC, Nóbrega F, et al. Current status of herpesvirus identification in the oral cavity of HIV-infected children. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013;46:15-9.
37. Magalhães IM, Martins RV, Cossatis JJ, et al. Detection of human herpesvirus 6 and 7 DNA in saliva from healthy adults from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010;105:925-7.
38. Matrajt L, Gantt S, Mayer BT, Krantz EM, Orem J, Wald A, Corey L, Schiffer JT, Casper C. Virus and host-specific differences in oral human herpesvirus shedding kinetics among Ugandan women and children. *Sci Rep.* 2017;7:13105.
39. Ambinder RF, Wingard JR, Burns WH, et al. Detection of Epstein-Barr virus DNA in mouthwashes by hybridization. *J Clin Microbiol.* 1985;21:353-6.
40. Braz-Silva PH, Ortega KL, Rezende NP, et al. Detection of Epstein-Barr virus (EBV) in the oral mucosa of renal transplant patients. *Diagn Cytopathol.* 2006;34:24-8.
41. Passoto SG, Natalino RR, Chakkour HP, et al. EBV reactivation serological profile in primary Sjögren's syndrome: an underlying trigger of active articular involvement? *Rheumatol Int.* 2013;33:1149-57.

Tabela 4.1 - Classificação da Xerostomia (Seminars in Radiation Oncology, ref 18)

Grau 0	Grau 1	Grau 2	Grau 3
Nenhuma alteração	Discreta Secura, sem interferência nos hábitos alimentares	Sintoma, securo em boca, requer líquido para engolir.	Sintomas severos, intensa securo em boca, alteração na dieta, interferência no sono, fala ou outras atividades. Sonda naso-enteral

Fonte: O autor.

Tabela 4.2 - Sequência de bases que caracterizam o DNA da família *Herpesviridae*

Primers	Sequências (5' – 3')
HSVP1	5'-GTGGTGGACTTTGCCAGCCTGTACCC-3'
HSVP2	5'-TAAACATGGAGTCCGTGTGCGCCGTAGATGA-3'
VZVP1	5'-GTCGTGTTTGATTTTCAAAGTTTATATCC-3'
VZVP2	5'-ATAAACACACAATCCGTATCACCATAAATAACCT-3'

Fonte: O autor.

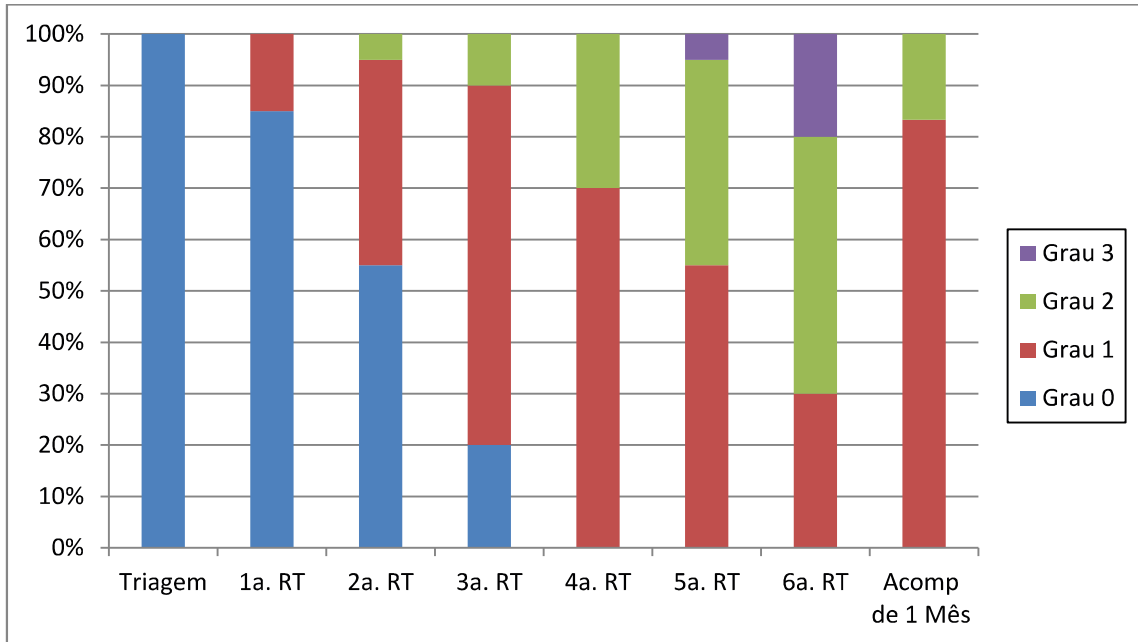
Tabela 4.3 - Excreção oral dos herpesvirus EBV, HHV-7, HSV-1, e HHV-6 em cada paciente em relação à Triagem e em cada semana durante a radioterapia (RT)

Pacientes	Triagem			1ª semana			2ª semana			3ª semana			4ª semana			5ª semana			6ª semana							
	EB	H7	H1	EB	H7	H1	EB	H7	H1	EB	H7	H1	EB	H7	H1	EB	H7	H1	EB	H7	H1	EB	H7	H1	H6	
1																										
2																										
3																										
4																										
5																										
6																										
7																										
8																										
9																										
10																										
11																										
12																										
13																										
14																										
15																										
16																										
17																										
18																										
19																										
20																										
Valor de P				.375	.687	.500	1.00	.070	.453	.250	1.00	.179	.125	.250	1.00	.179	.218	1.00	1.00	.179	.726	1.00	1.00	1.00	1.00	

Os espaços em branco indicam casos negativos. EB = EBV; H7 = HHV-7; H1 = HSV-1; H6= HHV-6. Valor de P para Teste de McNemar, comparando a triagem e cada semana de RT. Significante quando p<0.05.

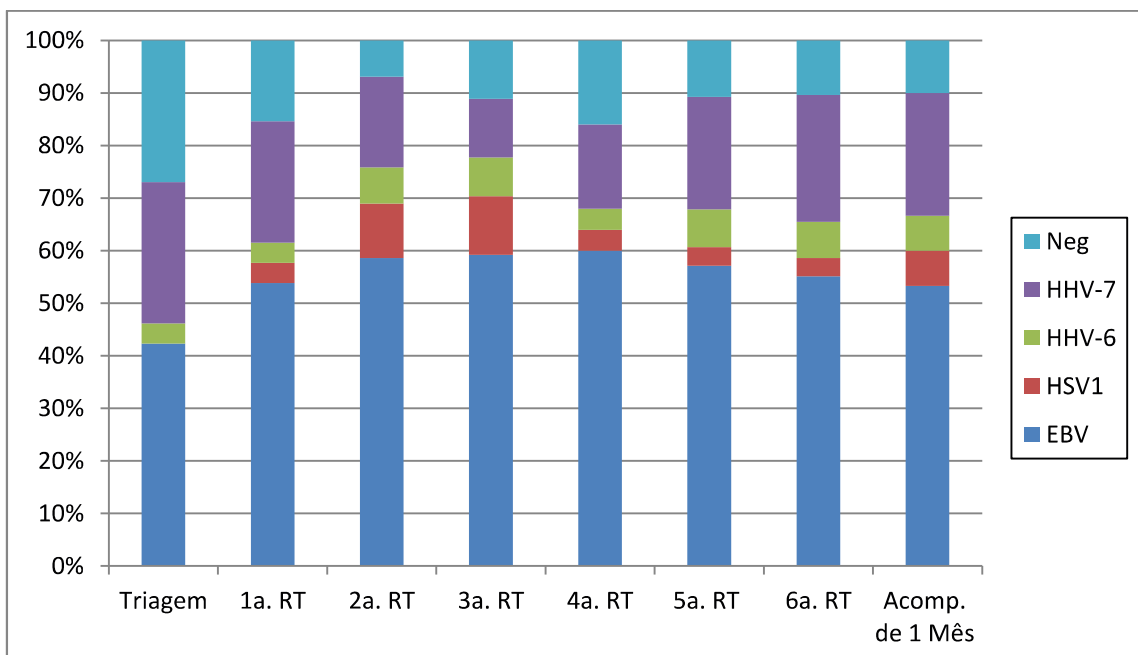
Fonte: O autor.

Figura 4.1 - Graus de xerostomia e semanas de RT



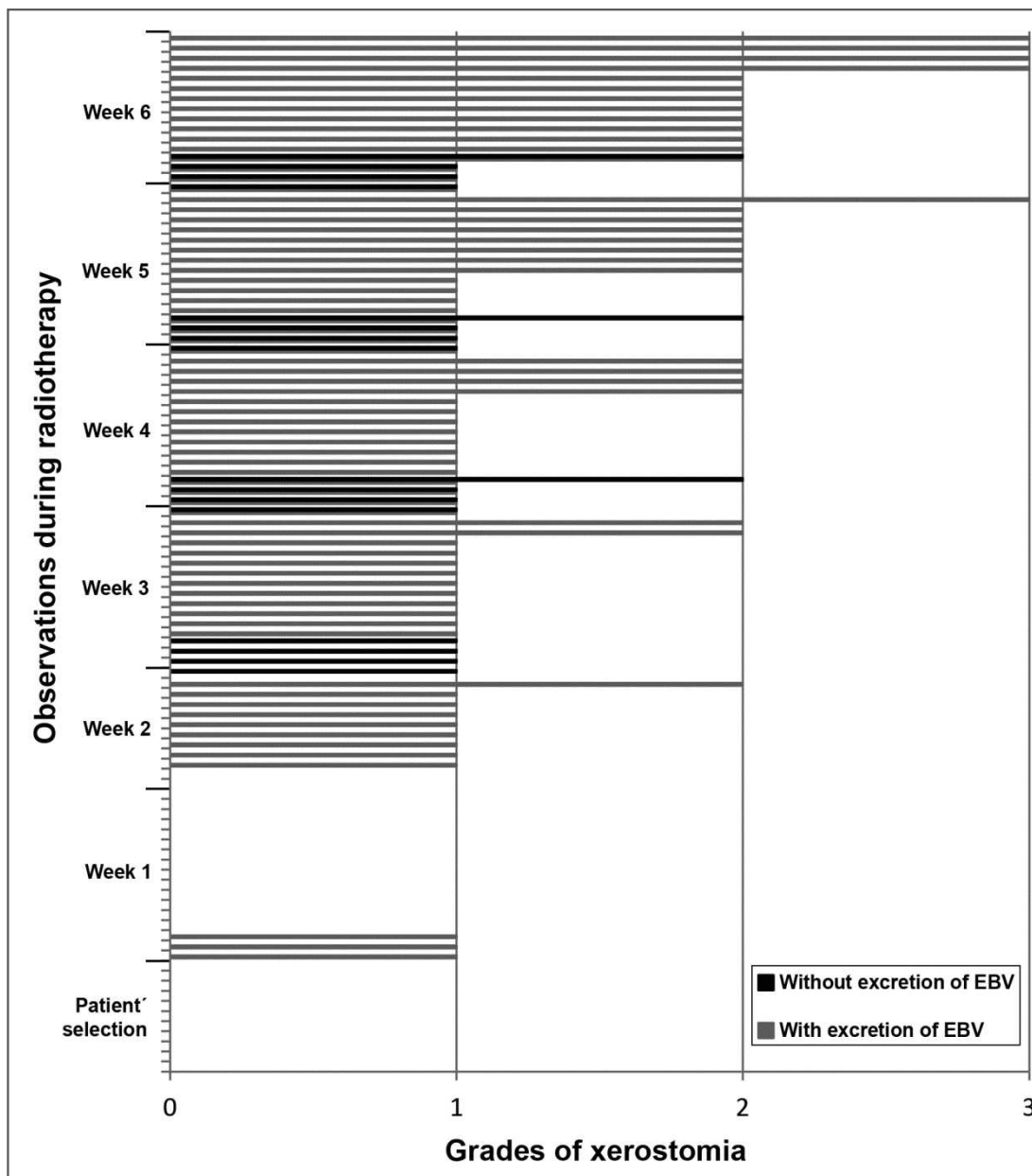
Fonte: O autor.

Figura 4.2 - Frequência de excreção oral dos herpesvírus na triagem, durante a RT e na consulta de 1 mês de acompanhamento



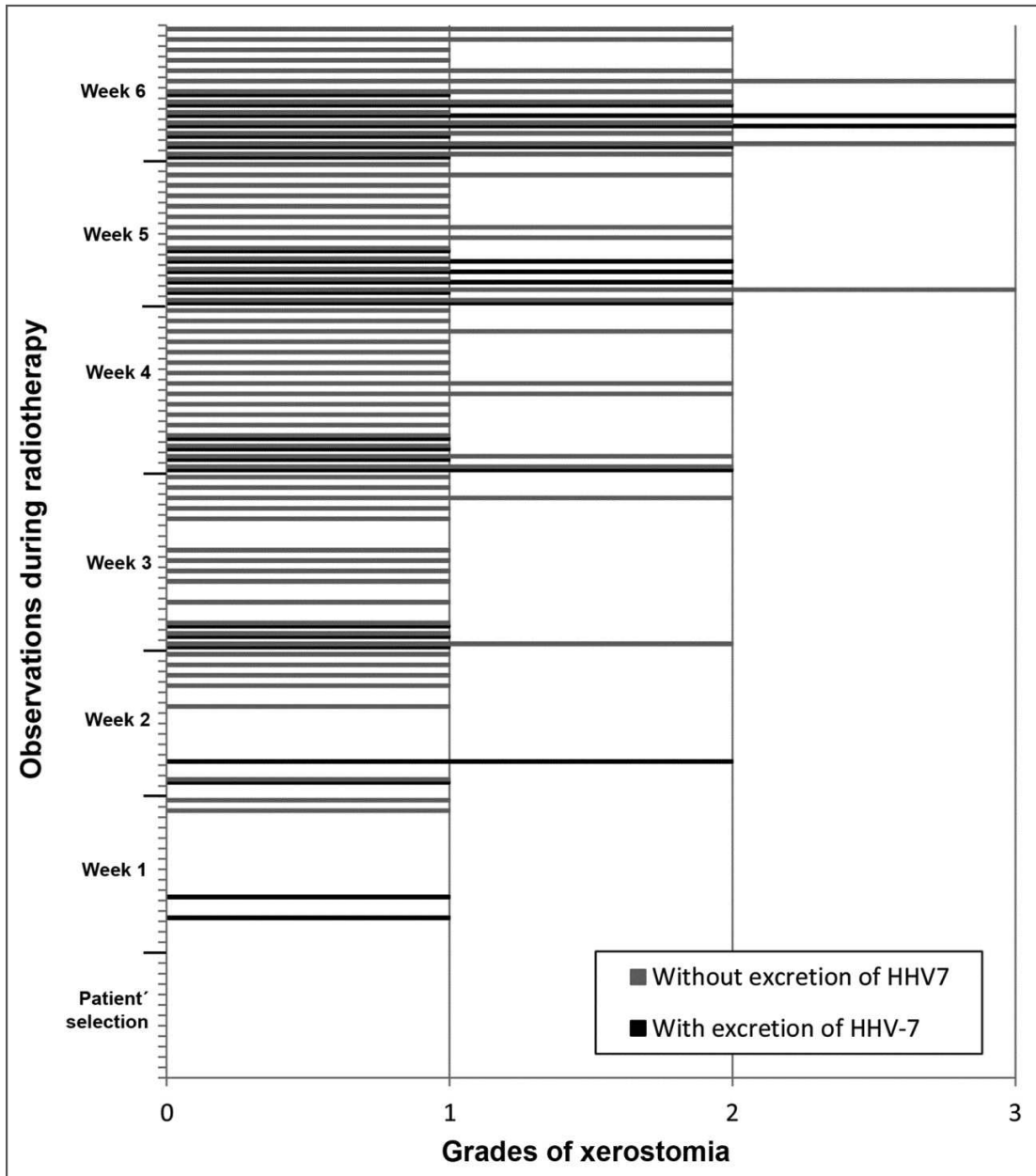
Fonte: O autor.

Figura 4.3 - Frequência da excreção oral do EBV em relação aos graus de xerostomia observada na triagem e durante a RT



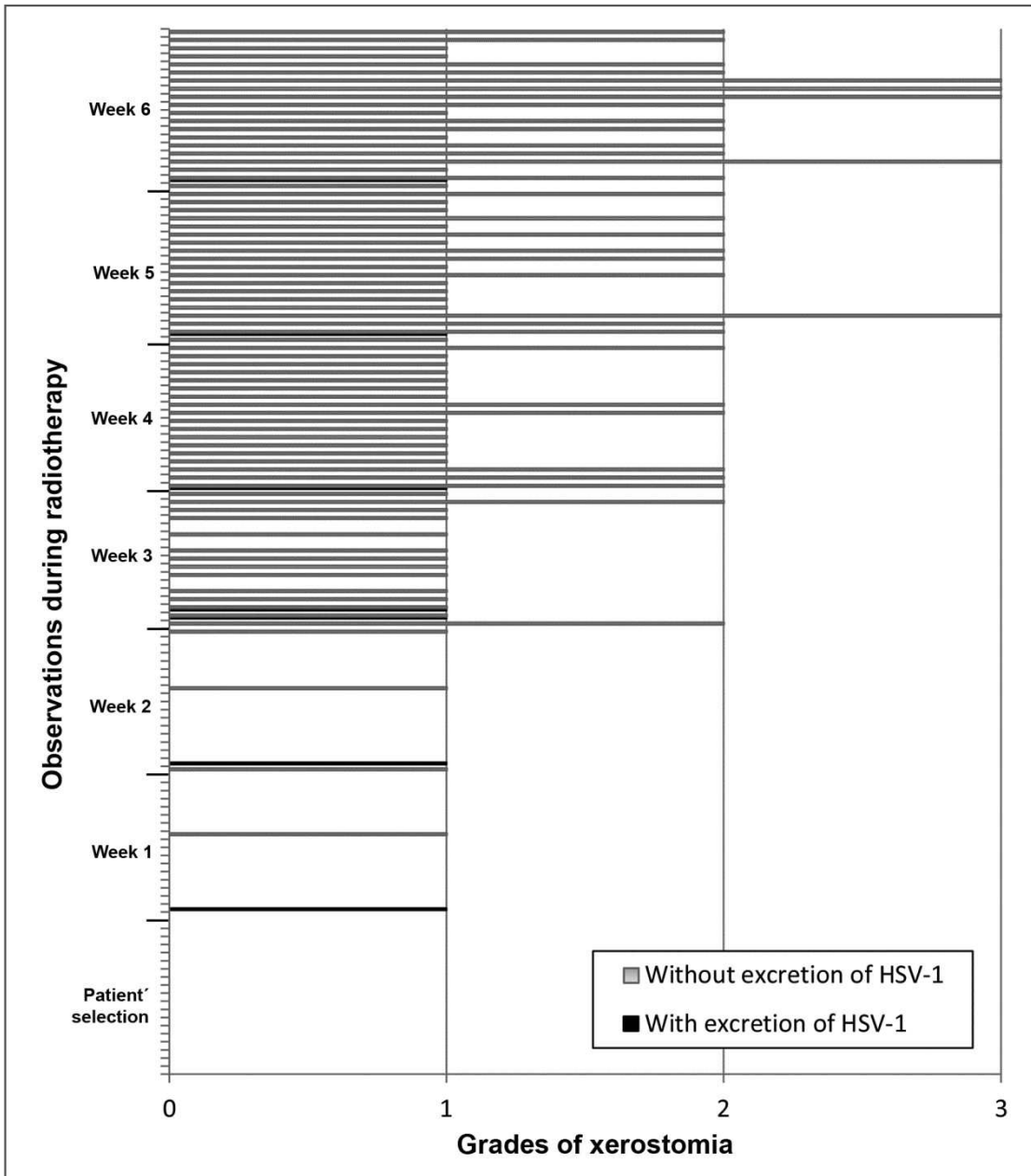
Fonte: O autor.

Figura 4.4 - Frequência da excreção oral do HHV-7 em relação aos graus de xerostomia observada na triagem e durante a RT



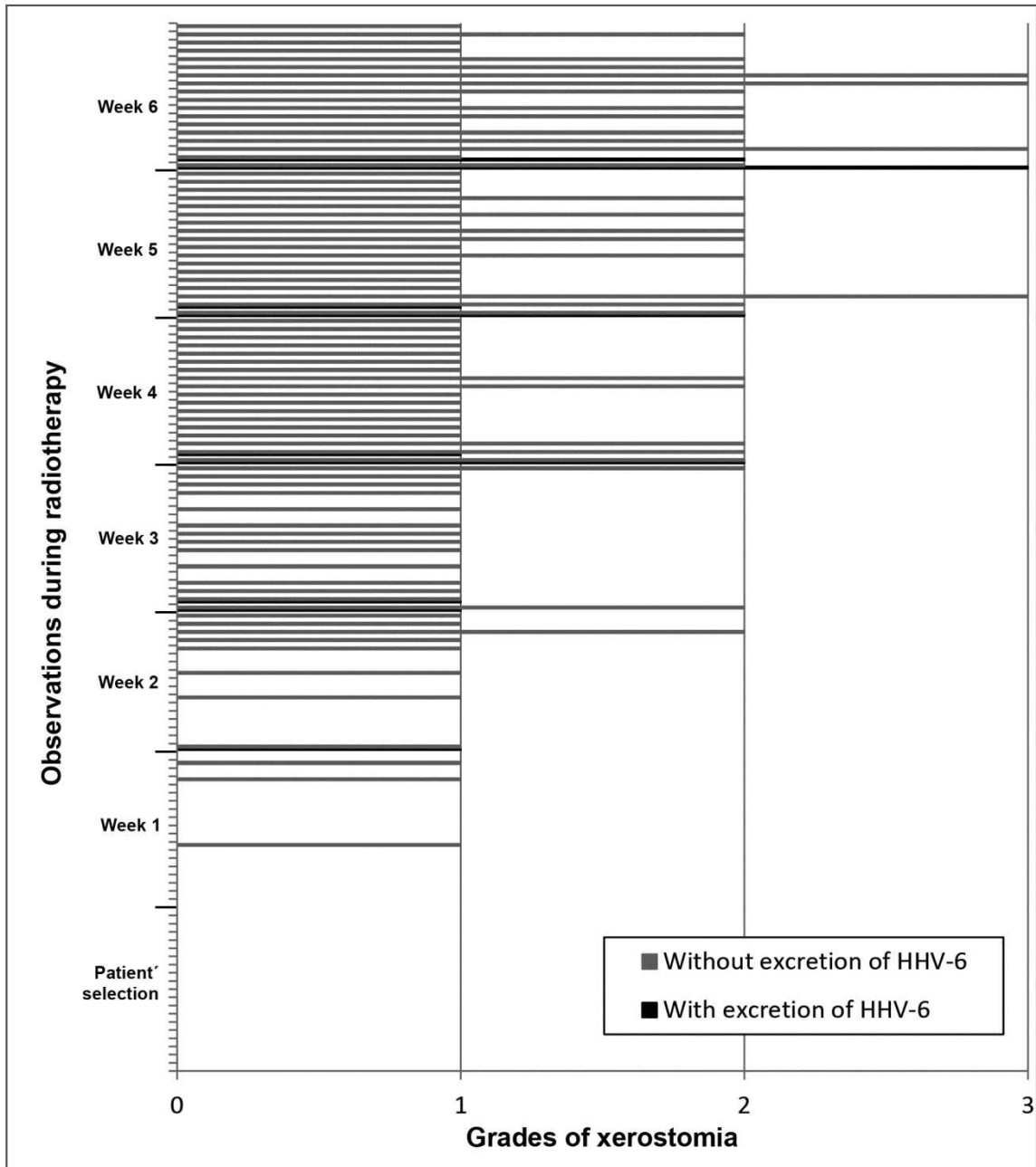
Fonte: O autor.

Figura 4.5 - Frequência da excreção oral do HSV-1 em relação aos graus de xerostomia observada na triagem e durante a RT



Fonte: O autor.

Figura 4.6 .- Frequência da excreção oral do HHV-6 em relação aos graus de xerostomia observada na triagem e durante a RT



Fonte: O autor.

5 CAPITULO III: ESTUDO PROSPECTIVO DA EXCREÇÃO ORAL, VIREMIA E STATUS SOROLÓGICO DO HERPESVÍRUS HUMANO TIPO 8 EM PACIENTES HIV POSITIVOS E HIV NEGATIVOS EM SÃO PAULO, BRASIL

5.1 Introdução

A transmissão do herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8), o agente do Sarcoma de Káposi (SK) e outros vírus associados a infecção ao vírus da imunodeficiência Humana (HIV), tem se revelado um assunto de evidências conflitantes.¹ Amostras orais tem consistentemente demonstrado, altas taxas de detecção viral do HHV-8 comparado ao sêmen, urina, secreção uretral, vaginal e anal, sugerindo que a saliva pode ter um representar um papel importante papel na transmissão de HHV-8.²⁻⁹ Por outro lado, a transmissão por sangue e transfusão de sangue permanece uma questão controversa, sem evidências conclusivas.¹⁰⁻¹² Estudos entre doadores de sangue fora de áreas endêmicas para SK, tem mostrado detecção muito rara do DNA do HHV-8 em amostras de sangue, mesmo entre indivíduos soropositivos para o HHV-8.^{10,11}

Associações entre o status sorológico do HHV-8 e a excreção oral do DNA do HHV-8 também é incerta, com alguns estudos mostrando inclusive, a excreção oral do HHV-8 em indivíduos soronegativos para o HHV-8.¹³ A falta de um padrão-ouro para o status sorológico do HHV-8 agrava ainda mais a limitada capacidade de determinar o status de 'infecção verdadeira'.¹⁴

Este estudo teve como objetivo avaliar prospectivamente a frequência de detecção de HHV-8 na saliva, no soro e no plasma, e sua associação com o status sorológico do HHV-8 entre indivíduos soronegativos e soropositivos para o HIV no grupo de homens que fazem sexo com homens (HSH) e no grupo de mulheres soropositivas para HIV, grupos estes com maior probabilidade de infecção pelo HHV-8.

5.2 Métodos

5.2.1 Participantes do estudo e coleta das amostras

Uma amostra de conveniência de indivíduos de três grupos diferentes foi incluída: HSH soronegativos para HIV, HSH soropositivos para HIV e mulheres soropositivas para o HIV. Pacientes voluntários, referenciados do STD - Centro de Treinamento/AIDS-SP em São Paulo, foram encaminhados para atendimento odontológico no Centro de Atendimento a Pacientes Especiais da Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo - Brasil (CAPE - FOU SP), onde foram orientados quanto ao objetivo e procedimentos do estudo. Os pacientes não apresentavam histórico de SK ou outras lesões associadas ao HHV-8. Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre esclarecido e foram convidados a fazer um acompanhamento prospectivo durante um período de 6 meses (Anexo B e C). O acompanhamento consistiu em consultas quinzenais, por dois períodos consecutivos de 3 meses, separados por 60 dias, com atendimento no CAPE - FOU SP. Os pacientes trouxeram suas amostras diárias (segunda a sexta-feira) de bochechos com enxaguatório bucal (Listerine®, Johnson & Johnson, São Paulo, Brasil) realizados pelo próprio paciente (auto-coleta). Todos os participantes foram instruídos a bochechar com 5ml da solução enxaguatória, à noite, durante 1 minuto, e coletar todo o conteúdo do bochecho no tubo do tipo Falcon 50ml. As amostras foram armazenadas na casa dos pacientes, em geladeira a 4°C até a próxima consulta odontológica. O objetivo era coletar um total de 120 lavados bucais de cada paciente. Se um paciente não atingiu inicialmente esse número, a coleta foi prolongada por até 4 semanas (2 semanas em cada período de 3 meses) para atingir essa meta. Além disso, também foram coletadas amostras de sangue, no início do estudo e nas consultas mensais. Todas as amostras foram armazenadas a -80°C até o seu processamento.

5.2.2 Ensaio sorológicos

Seis amostras de soro de cada paciente foram testadas, realizadas de forma randômica, para sorologias para HHV-8 no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMT - USP), utilizando-se ensaios próprios de imunofluorescência (IFA) para identificar anticorpos para as proteínas virais latentes e líticas do HHV-8, e ensaio para um imunossorvente ligado a enzima do vírus inteiro do HHV-8 (ELISA) para detecção de imunoglobulina G (IgG), como descrito anteriormente.¹⁴

5.2.3 Ensaio moleculares HHV-8

5.2.3.1 *Extração de DNA*

O DNA foi extraído das amostras de lavado bucal, soro e plasma (200 µL) usando o NucliSENS® easyMAG® (bioMérieux, Durham, NC), um sistema IVD-rotulado e automatizado para extração total do ácido nucleico baseada na tecnologia de sílica magnética, de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de DNA foi mensurada por espectrofotometria em 260 nM em NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). O DNA da beta-globina também foi detectado em todas as amostras, utilizando a *real-time* PCR, de acordo com o protocolo do fabricante (DNA Taq Man; Applied Biosystems, Foster City, CA), a fim de avaliar a viabilidade do DNA isolado de cada amostra.

5.2.3.2 ORF 26 real time PCR

Amostras de lavado bucal, soro e plasma foram analisadas em triplicado para detecção e quantificação de DNA de HHV-8 usando *real time* PCR, conforme descrito anteriormente.¹¹ Quantidades do DNA do HHV-8 foram transformados log 10 para normalizar valores para análise. Amostras com ≥ 5 cópias/ml (0,7 log 10) foram consideradas positivas.

5.2.4 Análise estatística

As proporções de pacientes e dos dias, com detecção do DNA do HHV-8 em amostras de lavado bucal, soro e plasma, foram comparados entre os grupos e por ensaios sorológicos usando o teste estatístico do qui-quadrado. Para a análise quantitativa da excreção viral, a média dos valores do DNA do HHV-8 foi comparados entre as amostras com HHV-8 detectável usando os testes de Kruskal-Wallis e Wilcoxon. A concordância (concordância geral, positiva e negativa) inter-ensaio (sorologia) foi calculada usando proporções simples. Desempenho de ensaios sorológicos para detecção da excreção oral do HHV-8 foi calculado usando tabelas padrão 2 × 2, e os resultados foram obtidos com intervalo de confiança (IC) de 95%. Os dados foram analisados usando o Stata v14 (Stata Corp., College Station, TX).

5.3 Resultados

Na totalidade, 123 indivíduos (47 HSH soronegativos para HIV, 44 HSH soropositivos para o HIV e 32 mulheres soropositivos para o HIV) foram incluídos neste estudo, de Março de 2013 a Maio de 2013, e foram acompanhados por um período de seis meses. As características dos participantes são mostradas na tabela 5.1. Todos os indivíduos soropositivos para o HIV estavam tomando terapia antirretroviral altamente ativa (HAART) e cerca de 80% apresentavam cargas virais

do HIV indetectáveis no plasma (limiar para detecção: 50 cópias/ml) e alta contagem de CD4 + linfócitos T (68,1% dos homens e 75,0% das mulheres com contagem de CD4 + \geq 500 células/mm³) na inscrição.

Ao final do período de estudo, todos os pacientes apresentaram 120 amostras auto-coletadas de lavado bucal, seis amostras de soro e seis amostras de plasma. Quarenta e dois pacientes (34,1%) precisaram de um período prolongado para coletar as amostras de lavado bucal (variando de 3 a 20 amostras para um intervalo de 1 a 4 semanas).

No geral, 24/47 (51,1%) HSH soronegativos para HIV, 28/44 (63,6%) HSH soropositivos para o HIV e 12/32 (37,5%) mulheres soropositivas para o HIV apresentaram resultados positivos para pelo menos um ensaio sorológico do HHV-8 em seis ensaios (Tabela 5.1). Considerando cada ensaio separadamente, houve maior positividade pelo ELISA (48/123; 39,0%), seguido pela IFA-LANA (33/123; 26,8%), e IFA-lytic (22/123; 17,9%).

A concordância geral intra-ensaios em 738 amostras de soro foi de 100% (738/738) para ELISA, 99,2% (732/738) para IFA-LANA e 98,9% (730/738) para IFA-lytic, mostrando excelente reprodutibilidade para todos os testes. Pacientes com resultados discordantes intra-ensaio foram arbitrariamente considerados positivos porque a maioria (4/6) das suas amostras séricas foram positivas. A concordância intra-ensaio para os resultados negativos foi de 100% para cada ensaio (Tabela 5.2).

O DNA do HHV-8 não foi detectado em nenhuma das 738 amostras de soro ou plasma após teste de PCR em triplicado. O DNA do HHV-8 não foi detectado em nenhuma amostra de lavado bucal dos 59 indivíduos soronegativos para o HHV-8 (total de 7.080 amostras testadas), mas foi detectada em 18/64 (28%) amostras dos indivíduos soropositivos para o HHV-8: 7/24 (29,2%) dos HSH soronegativos para HIV e 11/28 (39,3%) dos HSH soropositivos para o HIV (Tabela 5.1). A frequência de detecção do DNA do HHV-8 em amostras dos pacientes que apresentaram excreção foi de 5,1% (110/2160) no geral, 4,8% (40/840) em amostras de HSH soronegativos para HIV e 5,3% (70/1320) em amostras de HSH soropositivos para o HIV ($p = 0,58$), com uma variação de amostras positivas entre 3/120 (2,5%) e 11/120 (9,2%) por paciente. A quantidade mediana de DNA do HHV-8 detectado entre os pacientes que apresentaram excreção foi significativamente maior entre os HSH soropositivos para

HIV e HSH soronegativos para HIV (3,7 vs. 2,8 log 10 cópias/mL, $p < 0,01$; Tabela 5.1).

O perfil sorológico do HHV-8 e o desempenho dos ensaios sorológicos individuais e combinados para detectar os pacientes que apresentaram excreção de HHV-8, entre os 91 homens, é mostrado na tabela 5.3. A avaliação não incluiu as mulheres, uma vez que nenhuma teve excreção do HHV-8 positiva. O ELISA para o vírus completo, apresentou a maior sensibilidade (100,0%; IC 95%: 81,5–100,0), a menor especificidade 67,1%; IC 95%: 55,1-77,7), mas altos valores preditivos negativos (VPN; 100,0%; IC95%: 92,7-100,0). A melhor combinação de ensaios foi do ELISA juntamente com IFA-LANA devido a sua alta especificidade (91,8%; IC95%: 83,0–96,9) sem muita perda de sensibilidade (83,3%; IC95%: 58,6-96,4) e alto valor preditivo positivo (VPP; 71,4%; IC95%: 47,8-88,7; Tabela 5.3).

5.4 Discussão

Nessas populações de alto risco, 29% dos pacientes duplamente positivos para HHV-8/HSH soropositivos HIV, bem como 39% dos pacientes positivos para HHV-8/HSH soronegativos para o HIV, estavam excretando DNA do HHV-8 pelo menos uma vez durante um período de 6 meses, enquanto nenhuma das pacientes duplamente positivas para HHV-8/ mulheres soropositivas para HIV apresentaram excreção. Entre os HSH, a frequência de excreção oral, foi baixa (cerca de 5% dos dias), independentemente da sorologia para o HIV e apesar do grande número de amostras (120) testadas por indivíduo. No entanto, a quantidade média de DNA de HHV-8 nas amostras orais, durante os episódios, foi significativamente maior entre os pacientes soropositivos para HIV. Em comparação com outros ensaios sorológicos, ELISA foi o melhor teste para identificar os pacientes que excretam HHV-8, pois combina o VPN mais alto (não houve excreção detectada entre os indivíduos soronegativos para o ELISA) e a maior sensibilidade. O padrão de excreção oral do HHV-8 foi esporádico para todos os 18 indivíduos, com dias de excreção variando de 2,5% a 17% e muito poucos episódios de excreção oral ocorrendo em dias consecutivos.

Os achados presentes diferem de outros estudos que relataram alta frequência (32-68%) de excreção do HHV-8 e altas cargas virais entre mulheres soropositivas para o HIV na África.^{3,4} Esses estudos foram realizados em regiões endêmicas para o SK (Quênia) entre populações bem específicas (profissionais do sexo que não usavam HAART).^{3,4} O pequeno número de mulheres soropositivas para o HHV-8 no presente estudo, as diferentes características dos participantes e o fato dos pacientes brasileiros serem imunologicamente bem controlados com HAART pode explicar essa diferença nos resultados. No entanto, deve considerar-se, que alguns estudos sobre suscetibilidade de gênero para o HHV-8 e o SK relatam que as mulheres são mais resistentes que os homens à infecção pelo HHV-8 e ao desenvolvimento da doença, o que sugere que os hormônios femininos podem fornecer proteção às mulheres.^{15,16}

Poucos estudos analisaram sistematicamente as frequência e dinâmica da excreção oral de HHV-8 nas áreas não endêmicas para SK.^{2,5-7,17,18} Nos Estados Unidos, Pauk et al., analisaram 1.134 amostras orofaríngeas, obtidas da coleta oral diária, entre 23 HSH soropositivos para HHV-8 (incluindo 14 homens soropositivos para o HIV) por um período de aproximadamente 50 dias. Eles encontraram DNA do HHV-8 em cavidade oral ao menos uma vez em 13 participantes (57%), com cerca de 50% dos homens tendo excreção oral frequente (definida como $\geq 35\%$ de amostras positivas).² Outro estudo do mesmo grupo mostrou detecção oral frequente e intermitente do HHV-8: 44 amostras orofaríngeas de HSH, coletadas por períodos entre 25 e 135 dias e 27 dessas amostras (61%) apresentaram pelo menos uma amostra positiva para o HHV-8. No entanto, os autores também descreveram a excreção oral do HHV-8 como intermitente e esporádica.⁶ Um estudo recente comparou a excreção oral do HHV-8 entre diferentes populações (Estados Unidos, Peru, Camarões, Uganda e Quênia), e os autores não encontraram um padrão regular de excreção oral de HHV-8, com uma grande variabilidade observada entre os participantes.¹⁷

O presente estudo encontrou alta prevalência de anticorpos para o HHV-8 nos três grupos, embora isso tenha variado de acordo com o ensaio utilizado (variando de 18,7% com IFA-lytic a 56,8% para ELISA). A falta de um padrão-ouro para o diagnóstico sorológico do HHV-8 continua sendo um obstáculo para comparar a sensibilidade e especificidade de cada ensaio, dificultando o estabelecimento do teste mais confiável para discriminar quais os reais indivíduos infectados com HHV-8 e

quais os indivíduos não infectados.¹⁴ Testando às cegas, seis amostras sequenciais de soro de cada paciente, fez com que o presente estudo mostrasse uma excelente concordância intra-ensaio para as três técnicas. Avaliando todas as 738 amostras dos 123 indivíduos participantes no estudo, a concordância intra-ensaio foi $\geq 99\%$ para todos os ensaios.

Um dos objetivos deste estudo foi determinar o desempenho dos ensaios sorológicos para identificar os pacientes que apresentaram excreção oral do HHV-8. O ensaio ELISA teve a maior sensibilidade, confirmando os relatos anteriores^{9,11,14}, uma especificidade moderada e uma alta VPN. A combinação com o ensaio IFA-LANA aumentou a especificidade sem perder muito em sensibilidade, e teve o maior valor preditivo positivo (VPP) para detectar os pacientes que apresentaram excreção.

Verificou-se que nenhuma das 738 amostras de sangue, incluindo aquelas dos 18 pacientes que apresentaram excreção oral, foi positiva para o DNA do HHV-8, apesar dos testes realizados em triplicata, confirmando assim constatações anteriores de que em áreas não endêmicas para o SK, a detecção do HHV-8 em sangue periférico é muito rara, mesmo entre indivíduos soropositivos para o HHV-8, como por exemplo, em doadores de bancos de sangue.^{10,11} A doação de sangue por HSH levantou preocupações sobre a possibilidade de transmissão HHV-8 e em alguns locais, foi proposto impor uma restrição de doação para este grupo.¹² Esta recomendação não é apoiada pelos presentes resultados desse estudo, pelo menos em relação ao HHV-8.

5.5 Conclusão

Em conclusão, na população brasileira imunologicamente controlada, a excreção oral do HHV-8 foi limitada a homens soropositivos para o HHV-8, ocorrendo de maneira infrequente e intermitente, e não estava associada à viremia por HHV-8, sugerindo um potencial limitado para transmissão oral ou sanguínea.

REFERÊNCIAS

1. Vitale F, Viviano E, Perna AM, et al. Serological and virological evidence of non-sexual transmission of human herpesvirus type 8 (HHV8). *Epidemiol Infect.* 2000;125:671-5.
2. Pauk J, Huang ML, Brodie SJ, et al. Mucosal Shedding of human herpesvirus 8 in men. *N Engl J Med.* 2000; 343:1369-77.
3. Taylor MM, Chohan B, Lavreys L, et al. Shedding of human herpesvirus 8 in oral and genital secretions from HIV-1-seropositive and –seronegative Kenyan Women *J Infect Dis.* 2004;190:484–8.
4. Phipps W, Saracino M, Selke S, et al. Oral HHV-8 replication among women in Mombasa, Kenya. *J Med Virol.* 2014;86:1759-65.
5. Widmer IC, Erb P, Grob H, et al. Human herpesvirus 8 oral shedding in HIV-infected men with and without Kaposi Sarcoma. *Acquiring Immune Defic Syndr.* 2006;42:420-5.
6. Casper C, Krantz E, Selke S, et al. Frequent and asymptomatic oropharyngeal shedding of human herpesvirus 8 among immunocompetent men. *J Infect Dis.* 2007;195:30–6.
7. Casper C, Redman M, Huang ML, et al. HIV infection and human herpesvirus-8 oral shedding among men who have sex with men. *Acquiring Immune Defic Syndr.* 2004;35:233–8.
8. Del Mistress A, Baboci L, Frayle-Salamanca H, et al. Oral human papillomavirus and human herpesvirus-8 infections among human immunodeficiency virus type 1-infected men and women in Italy. *Fri Broadcast Dis.* 2012;39:894-8.
9. Souza VAUF, Sumita LM, Nascimento MC, et al. Human herpesvirus-8 infection and oral shedding in Amerindian and non-Amerindian populations in the Brazilian Amazon region. *J Infect Dis.* 2007;196:844–52.
10. Qu L, Jenkins F, Triulzi DJ. Human herpesvirus 8 genomes and seroprevalence in United States blood Donors *Transfusion* 2010; 0:1050-6.
11. Levi JE, Nascimento MC, Sumita LM, et al. Non- detection of human herpesvirus 8 (HHV-8) DNA in HHV-8-seropositive blood donors from three Brazilian regions. *PLoS One.* 2011;6:e23546.
12. Vamvakas EC. Relative risk of reducing the lifetime deferral blood donation for men who have had sex with men versus currently tolerated transfusion risks. *Transfus Med Rev.* 2011;5:47–60.
13. Johnston C, Orem J, Okuku F, et al. Impact of HIV infection and Kaposi sarcoma on human herpesvirus-8 mucosal replication and dissemination in Uganda. *PLoS One.* 2009;4: e4222.

14. Birth MC, De Souza VA, Sumita LM, et al. Comparative study of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus serological assays using clinically and serologically defined reference standards and latent class analysis. *J Clin Microbiol.* 2007;45: 715–20.
15. Souza V, Sumita LM, Freire W, et al. Prevalence of antibodies to human herpesvirus-8 in populations with and without risk for infection in Sao Paulo State. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37:123-7.
16. Pierrotti LC, Etzel A, Sumita LM, et al. Human herpesvirus 8 (HHV-8) infection in HIV/AIDS patients from Santos, Brazil: seroprevalence and associated factors. *Sex Transm Dis.* 2005;32:57-63.
17. Bender Ignacio RA, Goldman JD, Magaret AS, et al. Patterns of human herpesvirus-8 oral shedding among diverse cohorts of human herpesvirus-8 seropositive persons. *Infect Agent Cancer.* 2016;11:7.
18. Tozetto-Mendoza TR, Sumita LM, Palmieri M, et al. No detectable human herpesvirus-8 oral shedding in seronegative-healthy, immunocompetent tent individuals from non-endemic regions for Kaposi's sarcoma: A pilot study. *J Invest Clin Dent.* 2018;9:e12278.

Tabela 5.1 - Características dos participantes e anticorpo para HHV-8 e detecção do DNA entre pacientes HIV positivos e HIV negativos em São Paulo, Brasil

	Homens HIV negativos N=47	Homens HIV positivos N=44	Mulheres HIV positivos N=32	Valor de p
Características				
Idade (anos), (média)	30 (26-37)	40 (35-45)	42 (39-52)	<0.01 ^{&}
Proporção c/ CD4+ >500 cel/mm ³ (%)	n/a	30 (68.1)	24 (75.0)	0.52
Proporção c/ HIV não detectável PVL (%) [*]	n/a	35 (79.5)	27 (84.3)	0.59
Sorologia positiva para HHV-8				
ELISA (%)	18 (38.3)	24 (54.6)	6 (18.8)	<0.01 [#]
IFA-LANA (%)	14 (29.8)	13 (29.6)	6 (18.8)	0.49
IFA-Lytic (%)	8 (17.0)	10 (22.7)	4 (12.5)	0.51
Qualquer ensaio (%)	24 (51.0)	28 (63.6)	12 (37.5)	0.08
Deteção do DNA do HHV-8 entre os pacientes				
Soro ^{**}	0	0	0	-
Plasma ^{**}	0	0	0	-
Saliva (análise por indivíduo)				
Indivíduos positivos / testados (%)	7/47 (14.9)	11/44 (25.0)	0	0.23 [§]
Saliva (análise por amostras) ^{**}				
Amostras positivas / testadas (%)	40/5,640 (0.7)	70/5,280 (1.3)	0	<0.01 [§]
Deteção do DNA do HHV-8 somente entre pacientes soropositivos para HHV-8				
Análise por indivíduo				
Indivíduo Positivo / testados (%)	7/24 (29.2)	11/28 (39.3)	0	0.71 [§]
Análise por amostra ^{**}				
Amostras Positivas/testadas (%)	40/2880 (1.4)	70/3360 (2.1)	0	0.04 [§]
Amostras Positivas/amostras dos pacientes que excretaram (%)	40/840 (4.8)	70/1320 (5.3)	0	0.58 [§]
log ₁₀ cópias/ml de DNA do HHV-8	2.8 (2.4 – 3.2)	3.7 (3.3 – 4.5)	0	<0.01 [§]

Variáveis contínuas são apresentadas como médias e intervalos interquartis; P = valores são apresentados para comparação entre três grupos

[&]O grupo masculino de HIV negativo foi significativamente diferente dos grupos masculino de HIV positivo e do grupo feminino de HIV positivo em comparação pareada; A diferença entre os grupos masculinos de HIV positivo e feminino de HIV positivos não foi significativa

[#]Em comparação pareada, a positividade do ELISA foi significativamente diferente apenas entre os grupos masculinos de HIV positivos e femininos HIV positivos

^{*} Limiar para detecção de 50 cópias / ml

^{**} por análise de amostra: 6 amostras de soro, 6 de plasma e 120 de saliva por paciente

[§] Comparação entre grupos masculinos HIV negativos e homens HIV positivos

Fonte: O autor.

Tabela 5.2 - Concordância Intra-ensaios para 6 amostras de soro obtidas de 123 patients pacientes em São Paulo, Brasil

Ensaio	Concordância geral % (n/N)	Concordância entre resultados positivos % (n/N)	Concordância entre resultados negativos % (n/N)	Kappa (95% IC) Para todos	Valores de <i>p</i>
ELISA	100% (738/738)	100% (288/288)	100% (450/450)	100%	<0.0001
IF-LANA	99.2% (732/738)	96.9% (192/198)	100% (540/540)	96%	<0.0001
IF-lytic	98.9% (730/738)	94.2% (130/138)	100% (600/600)	94%	<0.0001

Fonte: O autor.

Tabela 5.3 - Desempenho dos ensaios sorológicos para detecção salivar do DNA do HHV-8 excretados entre 91 homens (47 HIV soropositivos and 44 HIV soronegativos HSH)

Ensaio sorológico	Positividade n (%)	Sensibilidade % (95% IC)	Especificidade % (95% IC)	Valores predictivos positivos % (95% IC)	Valores predictivos negativos % (95% IC)
ELISA	18 (100.0)	100.0 (81.5-100.0)	67.1 (55.1-77.7)	42.9 (27.7-59.0)	100.0 (92.7-100.0)
IFA LANA	15 (83.3)	83.3 (58.6-96.4)	83.6 (73.0-91.2)	55.6 (35.3-74.5)	95.3 (86.9-99.0)
IFA Lytic	6 (33.3)	33.3 (13.3-59.0)	83.6 (73.0-91.2)	33.3 (13.3-59.0)	83.6 (73.0-91.2)
ELISA + IFA LANA	15 (83.3)	83.3 (58.6-96.4)	91.8 (83.0-96.9)	71.4 (47.8-88.7)	95.7 (88.0-99.1)
ELISA + IFA Lytic	6 (33.3)	33.3 (13.3-59.0)	93.2 (84.7-97.7)	54.5 (23.4-83.3)	85.0 (75.3-92.0)
ELISA + IFA LANA + IFA Lytic	6 (33.3)	33.3 (13.3-59.0)	98.6 (92.6-100.0)	85.7 (42.1-99.6)	85.7 (76.4-92.4)
IFA LANA + IFA Lytic	6 (33.3)	33.3 (13.3-59.0)	94.5 (86.6-98.5)	60.0 (26.2-87.8)	85.2 (75.6-92.1)

Fonte: O autor.

6 CAPITULO IV: EXCREÇÃO ORAL DE HERPESVIRUS HUMANOS EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS

6.1 Introdução

O transplante renal é considerado o melhor tratamento para a reabilitação de um paciente com doença renal em estágio terminal. Os avanços nos medicamentos imunossupressores e a consolidação dos programas de transplante fizeram do Brasil o país com o maior número de transplantes realizados no sistema público de saúde, com uma média de 5.000 transplantes de rim por ano, nos últimos 10 anos. Atualmente, o sucesso dos transplantes é decorrente principalmente do controle do processo de rejeição, devido a uma melhor compreensão do processo imunológico desencadeado pelo transplante, e pelo desenvolvimento de agentes imunossupressores eficazes. Apesar disso, existe um risco potencial de infecções primárias ou oportunistas em pacientes transplantados.¹⁻⁴

Complicações virais infecciosas, em pacientes transplantados renais, causadas pelos vírus da família *Herpesviridae*, tais como herpes vírus simples 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2), citomegalovírus (CMV), varicela zoster vírus (VZV) e Epstein Barr vírus (EBV), foram descritas na literatura.^{5,6} Outros membros desta família, tais como herpesvirus humano tipo 6 (HHV-6A e B), herpesvirus humano tipo 7 (HHV-7) e herpesvirus humano tipo 8 (HHV-8) foram menos descritos pois eles estão menos associados às complicações em pacientes transplantados renais.⁷⁻¹⁰

A coleta de saliva é reconhecida como um método não invasivo, com grande potencial para diagnóstico e detecção de microrganismos, como os vírus da família *Herpesviridae*.¹¹⁻¹³ A detecção desses grupos virais na saliva de pacientes transplantados renais e pacientes renais crônicos já foi demonstrada na literatura.^{8,9,14-17} No entanto, a heterogeneidade das metodologias utilizadas e a variação em resultados obtidos pelos diferentes autores, não nos permite conhecer o padrão real de excreção salivar dos diferentes tipos de herpesvírus humanos em pacientes transplantados renais.

Apesar dos avanços médicos e farmacológicos, as infecções continuam sendo a causa mais frequente de mortalidade e 62,6% dos indivíduos transplantados desenvolvem pelo menos um episódio infeccioso. A incidência de infecções varia entre os centros.^{3,6} O impacto das infecções por herpesvírus em pacientes transplantados renais tem sido constantemente estudado,^{1,2,9} mas até o momento, essas pesquisas não encontraram estratégias ou métodos seguros para prever as formas de infecção ativas. Embora existam protocolos disponíveis para prevenir as infecções por herpesvírus, ainda existe um número considerável de rejeições de transplantes devido a essas infecções, principalmente àquelas causadas pelo CMV.^{5,6,17,18-20}

Não há estudos descritos que confirmem o verdadeiro motivo do aumento da excreção de herpesvírus nos transplantados renais, embora esse aumento já tenha sido relatado na literatura.^{8,9} Considerando que o sistema imunológico do paciente é essencial no controle de infecções oportunistas, assim como também é o fator primário na manutenção da latência viral, nossa hipótese é de que o tratamento imunossupressor seja responsável pelo aumento da excreção de herpesvírus em pacientes transplantados renais. Os receptores de transplante renal são submetidos ao tratamento imunossupressor, que por sua vez, pode facilitar a reativação dos herpesvírus, geralmente latentes em pacientes imunocompetentes ou ainda tornar o paciente mais suscetível a uma nova infecção.

Nesse contexto, descrever o perfil de excreção de herpesvírus humanos na saliva de pacientes transplantados renais é importante e pode ser usado como base para estudos que procurem determinar a relação entre excreção oral e a presença clínica de infecções e também a relação com as rejeições de transplantes. Portanto, o objetivo deste estudo foi descrever a excreção oral de herpesvírus humano em pacientes transplantados renais, utilizando uma técnica multiplex, que permite um método rápido e relativamente barato de detecção.

6.2 Materiais e Métodos

Trata-se de um estudo prospectivo de caso-controle. O grupo de estudo envolveu 50 pacientes transplantados renais, e o grupo controle envolveu 50 indivíduos não transplantados e imunocompetentes. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), de acordo com o protocolo no. 290/2011 (Anexo D), e todos os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

Os critérios de inclusão do grupo controle foram: ter mais de 18 anos, ser imunocompetente, não ser transplantado e não ter outra doença crônica. No grupo de estudo os critérios foram: pacientes com idade superior a 18 anos que realizaram apenas transplante renal, independentemente do período pós-transplante. Todos os participantes foram acompanhados no Departamento de Doenças Infecciosas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Amostras de lavado bucal foram coletadas após bochechos com 5 ml de água destilada por 30s. Um volume de 200µl foi obtido por centrifugação a 800 rpm em tubo cônico. As amostras foram divididas em alíquotas, em tubos criogênicos e armazenadas em freezer a -80°C até o momento da análise laboratorial.²¹

As extrações de DNA das amostras de lavado bucal foram realizadas no Laboratório de Virologia, Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMT – USP), usando o Kit Genomic DNA extraction (Real Genomics®, Real Biotech Corporation) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram processadas em três ambientes físicos diferentes em cada uma das etapas do procedimento, a fim de evitar a contaminação: 1) área de extração de ácido nucleico, 2) área de pré-PCR e 3) área de amplificação de DNA, com distribuição dos produtos da PCR e detecção de fragmentos de DNA após a PCR. Foram utilizados pelo menos três controles negativos (água Milli-Q) *por* ensaio, incluindo a intercalação das amostras. As amostras obtidas da extração de DNA foram submetidas à reação de amplificação do DNA com β-globina humana para avaliação de sua viabilidade.

Os herpesvírus humanos foram detectados por PCR e subsequente digestão enzimática. Dois conjuntos de primers, HSVP1 (5'-GTGGTGGACTTTGCCAGCCTGTACCC-3') / HSVP2 (5'-

TAAACATGGAGTCCGTGTCGCCGTAGATGA-3') e VZVP1 (5'-GTCGTGTTTGATTTTCAAAGTTTATATCC-3') / VZVP2 (5'-ATAAACACACAA TCCGTATCACCATAAATAACCT-3'), promoveram a reação, utilizando-se de regiões chave do DNA, que conservadas durante a purificação, sofreram lise mediante ação enzimática da DNA polimerase – com base no alinhamento das sequências de DNA dos oito herpesvírus humanos conhecidos.¹¹

Cada reação foi realizada em um volume total de 50 µl, que continha 5µl de solução tampão 10X Gold Star 10X (Promega, Madison, WI, EUA), 10µM de cada primer, 0,4µl (5U) de Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen) e 10µl de DNA extraído. As amostras foram inicialmente desnaturadas a 95°C por 5min, seguidas de 40 ciclos, incluindo desnaturação por 50s a 94°C, hibridação por 50s a 62°C, extensão por 60s a 72°C e extensão final a 72°C por 5min para HSVP1/P2. Em seguida, as amostras foram novamente desnaturadas a 95°C por 5min seguidas de 45 ciclos, incluindo desnaturação por 50s a 94°C, hibridação por 50s a 50°C, extensão por 50s a 72°C e extensão final a 72°C por 5min para VZVP1/P2. Controles positivos de uma cultura de herpesvírus também foram incluídos, enquanto o controle negativo foi a água. Todas as reações de amplificação foram realizadas em termociclador (PTC 200MJ Research). Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,75%, corados com solução de brometo de etídio (10mg/ml, Invitrogen) e expostos à luz ultravioleta para visualização.

Cada mistura de reação na qual os amplicons foram detectados foi submetida à digestão com as enzimas de restrição BamHI e BstUI (New England Biolabs). A mistura de digestão consistiu em 10µl de mistura de PCR, 1,5µl de uma solução tampão enzimática apropriada, 1µl de enzima e 2,5µl de água Milli-Q para um volume total de 15µl. As misturas da reação foram incubadas por 1 hora a 37°C (BamHI) e depois a 60°C (BstUI). Todos os testes foram realizados no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo.

As variáveis "idade" (Kolmogorov-Smirnov $Z = 0,610$, $P = 0,850$) e "meses após transplante" (Kolmogorov-Smirnov $Z = 1,306$, $P = 0,066$) apresentaram distribuição normal. Para comparação, caso necessário, das frequências de gênero entre os grupos (experimental e controle) quanto à presença de herpesvírus na saliva, foram utilizados o teste do qui-quadrado e o exato de Fisher. Para verificar as associações de excreção oral dos diferentes herpesvírus, com idade ou meses após transplante, foi utilizado o teste t de Student. Os dados resultantes foram analisados usando o

software SPSS 17.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, EUA). O nível de significância foi estabelecido em 5% para todos os testes estatísticos ($P < 0,05$).

6.3 Resultados

Nesse estudo foi possível observar que os pacientes transplantados renais apresentaram maior excreção de herpes vírus humanos em comparação ao grupo controle, exceto o HHV-6A e o HHV-7. Foi encontrada significância estatística para HSV-1 ($P = 0,025$) e EBV ($P = 0,024$) (Tabela 6.1).

A idade média dos pacientes transplantados renais foi de $49,42 \pm 12,94$ anos e os meses após transplante renal correspondiam a $68,20 \pm 67,19$ meses. Em relação ao gênero, 28/50 (56%) eram do gênero feminino. O grupo controle foi constituído por indivíduos não transplantados e imunocompetentes, com idade média de $30,28 \pm 7,72$ anos, sendo a maioria também do sexo feminino (40/50, 80%). Não encontramos relação entre sexo e excreção oral de herpesvírus em pacientes transplantados renais (Tabela 6.2).

A idade não influenciou a excreção oral dos herpesvírus em pacientes transplantados renais. A idade média dos pacientes positivos e negativos em relação à presença dos diferentes subtipos virais na saliva foi semelhante. Em geral, os indivíduos excretaram herpesvírus na saliva nos meses iniciais após o transplante renal, especialmente o VZV, que mostrou um valor estatisticamente significativo (Tabela 6.3).

6.4 Discussão

Complicações infecciosas após o transplante renal estão associadas a significativa morbidade. O principal objetivo deste estudo foi determinar o perfil de excreção oral dos herpesvírus humanos em pacientes transplantados renais, comparando os resultados com os observados na população imunocompetente. Os

indivíduos transplantados renais apresentaram maior excreção oral dos herpesvírus quando comparado ao grupo controle, e esse resultado foi estatisticamente significativo para HSV-1 e EBV. Somente o HHV-6A e o HHV-7 foram mais comuns na saliva de indivíduos saudáveis, mas sem significância estatística. Não há dados consistentes na literatura sobre o assunto proposto em nosso estudo. Encontramos estudos com pequenos grupos para análise de subtipos virais específicos da família *Herpesviridae*. Nesse contexto, nosso estudo é o primeiro a analisar a exceção oral de todos os herpesvírus em pacientes transplantados renais.

É possível que a imunomodulação dos pacientes transplantados renais induza a reativação de herpesvírus latentes, que seriam detectados apenas mais tardiamente após o transplante, o que pode estar relacionado à uma maior excreção desses vírus nesse grupo de pacientes. Carraro e Granato²² também propuseram essa explicação, mas avaliaram apenas o CMV usando a saliva para genotipagem de HCMV, bem como amostras de sangue ou urina.

Kaufman et al.²³ avaliaram a frequência da excreção oral do DNA do HSV-1, usando PCR, em lágrimas e saliva, coletadas duas vezes ao dia, por 30 dias consecutivos, em indivíduos assintomáticos e normais. Trinta e sete (74%) dos 50 indivíduos foram soropositivos para HSV IgG por ELISA. As porcentagens de esfregaços oculares e bucais positivos foram aproximadamente equivalentes: 33,5% (941/2806) e 37,5% (1020/2723), respectivamente. Esses resultados diferem dos nossos, o que pode ser justificado pelo fato de nossa coleta de saliva ter ocorrido apenas uma vez ao dia, enquanto a dos autores foi realizada duas vezes ao dia, por 30 dias consecutivos, em indivíduos normais.

Da Silva et al.²⁴ investigaram a frequência da reativação do HSV-1 na cavidade oral de 14 pacientes soropositivos para o HIV com história prévia de herpes labial recorrente (grupo recrudescente) e compararam com 11 indivíduos sem histórico de lesões recrudescentes (infecção assintomática pelo HSV-1). A presença de DNA do HSV-1 foi identificada por *nested* PCR. Eles concluíram que a excreção de HSV-1 na cavidade oral ocorre independentemente da presença do herpes labial recorrente. Este grupo é semelhante ao grupo dos indivíduos transplantados renais, uma vez que ambos os grupos são imunocomprometidos. Parece que a excreção oral não está relacionada à presença clínica de lesões, mas são necessários mais estudos prospectivos para comprovar essa hipótese no grupo de pacientes transplantados renais.

Yamamoto et al.¹⁷ coletaram amostras seriadas de saliva e urina de vinte crianças com doenças renais para elucidar a cinética de três β -herpesvírus (CMV, HHV-6 e HHV-7) durante um período de 1 ano. As cargas de DNA viral foram medidas usando *real-time* PCR. Em 10 pacientes soropositivos para o CMV, o DNA do CMV raramente foi detectado na saliva e sua carga viral foi menor do que a dos outros dois β -herpesvírus. Isso corrobora os resultados negativos para o CMV em nossos pacientes. Todos os pacientes do estudo dos autores acima, foram soropositivos para o HHV-6B, pois esse vírus foi detectado com mais frequência na saliva, no entanto, esse achado difere daqueles encontrados em nosso estudo. Dois dos 20 pacientes foram soronegativos para o HHV-7. Elevado número de cópias de DNA viral foi detectado continuamente na saliva de pacientes soropositivos para o HHV-7, um achado semelhante ao encontrado em nosso estudo. As cargas de DNA do HHV-6B foram significativamente maiores em pacientes com tratamento imunossupressor em comparação com aqueles sem tratamento. Nenhuma associação temporal notável entre excreção de DNA viral e proteinúria ou tratamento imunossupressor foi demonstrada no estudo dos autores. Eles concluíram que o padrão de excreção de DNA viral na saliva e na urina foi diferente entre os três vírus e não foi observada correlação temporal entre infecção viral e doenças renais. No presente estudo, também encontramos diferentes padrões de excreção oral de herpesvírus em pacientes transplantados renais.

O CMV é a infecção viral mais prevalente em pacientes transplantados renais e ocorre principalmente após o primeiro mês de transplante, com incidência estimada entre 30% e 78%.^{2,3,5,18} A infecção depende do status sorológico do indivíduo, os pacientes podem desenvolver uma infecção primária qualquer, uma superinfecção ou uma reativação do CMV. A presença de CMV no plasma é detectada por testes como a PCR.^{2,3,5,6,18,20} Clinicamente, a infecção por CMV se assemelha a mononucleose, mas pode levar a complicações como pneumonia, distúrbios hemorrágicos gastrointestinais, pancreatite, hepatite e doenças do sistema nervoso central. Na cavidade oral, pode se apresentar como ulcerações da mucosa.^{25,26} Os efeitos da infecção podem ser diretos, representado pelo desenvolvimento da doença em si, ou indiretos, como aumento do risco de rejeição aguda do enxerto e disfunção crônica do rim transplantado. Nenhum paciente no presente estudo apresentou excreção oral de CMV; esses resultados podem ser atribuídos ao fato de nossa amostra apresentar um

período médio pós-transplante longo ($68,20 \pm 67,19$ meses) e as infecções por CMV, em pacientes transplantados renais, são mais comuns até o terceiro mês (90 dias) pós o transplante.

Al-Otaibi et al.⁸ estudaram a excreção oral do HHV-8 em pacientes transplantados renais com Sarcoma de Kaposi, mostrando que a cavidade oral é um importante local de excreção oral do HHV-8 nesses pacientes, o que sugere que a saliva tem maior potencial de disseminar esse vírus do que o sangue. Em 2009, esses pesquisadores relataram um caso de um paciente transplantado renal na Arábia Saudita, do qual amostras pareadas de saliva, raspado bucal e sangue foram obtidas, do receptor e do doador, no período de 3 dias antes do transplante, até 38 semanas após o transplante. Antes do transplante, o receptor era soropositivo para a IgG anti-HHV-8, mas o doador era soronegativo. O DNA do HHV-8 pôde ser detectado no sangue e na saliva e no raspado bucal do receptor, e a carga viral salivar foi estimada em 2,6 milhões de cópias do genoma/ml. Após o transplante, a carga viral salivar do receptor aumentou inicialmente para 4,1 milhões de cópias do genoma/ml e, posteriormente, diminuiu vertiginosamente, coincidindo com um aumento na dose de Valaciclovir. Os autores concluíram então, que a imunossupressão e a profilaxia antiviral podem interagir para influenciar o espectro oral do HHV-8 e a extensão da excreção na cavidade oral.⁹ A prevalência da infecção pelo HHV-8 não é tão universal quanto a de outros herpesvírus com excreção oral. A amostra do presente estudo foi negativa para o HHV-8, e acreditamos que isso se deve principalmente ao fato de o Brasil não ser uma região endêmica para infecções por esse subtipo viral.

Os autores acima mencionados, também levantaram a hipótese de que a transmissão oral de HHV-8 entre pacientes em tratamento com hemodiálise contribui para a alta prevalência de infecção em pacientes com doença crônica renal, na Arábia Saudita. O estudo comparou pacientes em hemodiálise com pessoas aparentemente saudáveis e encontraram taxas de 16,7% *versus* 0,4% para IgG anti-HHV-8 ($P < 0,001$) e de 4,2% *versus* 0,4% para o DNA do HHV-8 ($P < 0,05$). A quantidade de vírus excretada na saliva variou entre 8.600 e 119.562.500 (média: 24.009.360) de equivalentes de genoma/ml entre os cinco pacientes nos quais o DNA do HHV-8 foi detectado. O fluido oral, além do sangue, é, portanto, um provável veículo para a transmissão do HHV-8 e pode possivelmente contribuir, juntamente com a imunossupressão, para o alto risco de infecção pelo HHV-8 em pacientes com sarcoma de Kaposi submetidos à hemodiálise. Mais estudos são necessários para

esclarecer os fatores específicos responsáveis pela transmissão do HHV-8 entre pacientes em hemodiálise.¹⁵ Acreditamos que um estudo específico dos subtipos de herpesvírus é importante em regiões endêmicas, como a Arábia Saudita.

Adicionalmente, Lima et al.²⁵ e López-Pinto et al.²⁶ relataram um caso de paciente transplantado renal que apresentou lesões orais associadas ao CMV e HSV. Neumann et al.²⁰ relataram um caso de infecção sistêmica por CMV manifestada como úlceras genitais e orais em um paciente transplantado renal, porém não há estudos que associem a excreção oral dos herpesvírus à presença de lesões orais.

A maioria dos pacientes deste estudo era do sexo feminino, com idade média de $49,42 \pm 12,94$ anos. Esses dados diferem do estudo de Ak et al.,⁶ que mostrou a maioria sendo do sexo masculino com idade média de 32,5 anos (variando de 12 a 68 anos) e com maior incidência de infecção em mulheres do que em homens. Em nossa pesquisa não se avaliou a presença clínica de herpesvírus. Yalci et al.³ observaram em seu estudo, idade média de $38,55 \pm 13,31$ anos, com pequena maioria dos homens. Os estudos de Al-Otaibi et al.⁸ e Meijers et al.² apresentaram idades médias semelhantes às do nosso trabalho. Variações nesses resultados podem ser atribuídas a fatores como tamanho da amostra e localização geográfica do estudo.

O presente estudo buscou avaliar se o sexo e a idade dos pacientes transplantados renais influenciaram a excreção oral dos herpesvírus humano, e foi possível observar que nenhuma das variáveis influenciou a excreção oral do herpesvírus. Esse resultado enfatiza que sexo e idade não determinam a presença de infecção viral, uma vez que em pacientes transplantados renais, receptores de aloenxerto, a terapia medicamentosa imunossupressora é a principal causa de imunossupressão e ocorrência das infecções.¹ No entanto, examinando a saliva de indivíduos normais, Kaufman et al.²³ relataram que os homens apresentaram maior frequência de excreção oral de HSV-1 (457/1009; 45,3%) em comparação com as mulheres (563/1703; 33,1%).

Observamos que os pacientes desta pesquisa tiveram média de $68,20 \pm 7,19$ meses após transplante renal e os herpesvírus foram mais excretados nos primeiros meses após o transplante, com resultado estatisticamente significativo para o VZV. Não existem dados na literatura que associem a presença de herpesvírus na saliva após o transplante renal, mas sabe-se que as infecções são mais comuns nos primeiros meses após o transplante, quando o paciente está em um período de

máxima imunossupressão.^{3,5,19} Essa afirmação pode justificar os dados encontrados no presente estudo sobre a relação entre período pós transplante e a excreção oral de herpesvírus em pacientes transplantados renais. Por exemplo, Al-Otaibi et al.⁹ observaram que a carga viral salivar de HHV-8 dos pacientes transplantados renais aumentou 60% após 1 mês de terapia imunossupressora. No que diz respeito à infecção por VZV, Mustapic et al.²⁷ analisaram 1.139 pacientes que receberam aloenxerto renal, e a infecção por VZV foi diagnosticada em 40 pacientes (3,51%). No presente estudo, apenas dois pacientes apresentaram excreção oral deste herpesvírus e o período médio após o transplante foi de $22,00 \pm 2,82$ meses.

Além disso, Al-Otaibi et al.⁸ relataram cinco casos de sarcoma de Kaposi em pacientes transplantados renais soropositivos para o HHV-8 e o diagnóstico ocorreu em vários intervalos após o transplante. Carraro & Granato²² relataram que na sua amostra, a infecção pelo CMV ocorreu em um tempo médio de 47 dias (34-105 dias) após o transplante renal. Os achados de Netchiporouk et al.²⁸ mostraram que a incidência de infecção pelo HSV em seus pacientes foi de aproximadamente 10% (10/98 casos). A maioria das infecções (8/10) ocorreu nos primeiros 2 anos após o transplante e a maior incidência (40%) foi encontrada no primeiro mês após a cirurgia.

Nossa pesquisa não avaliou a presença clínica de infecções por herpesvírus. Nosso trabalho propôs observar o perfil de excreção oral desses vírus na saliva de pacientes transplantados renais. Portanto, futuramente, são necessários mais estudos para mostrar a associação entre a excreção oral dos herpesvírus humano e apresentação clínica da doença nesse grupo de pacientes. Manifestações clínicas das infecções por herpesvírus com presença de herpesvírus na lesão foram relatadas na literatura em outros grupos de pacientes transplantados. Schmidt-Westhausen et al.²⁹ analisaram a presença de EBV no epitélio da borda lateral da língua em um grupo de pacientes transplantados de fígado, em comparação com um grupo controle, usando microscopia eletrônica. Observou-se que 15% dos pacientes transplantados de fígado apresentavam partículas típicas da família dos herpesvírus, enquanto todos os controles eram negativos para o EBV. Eles também observaram que 3 dos 5 pacientes positivos para EBV apresentavam leucoplasia pilosa, porém todos os pacientes eram negativos para o HIV. Portanto, é possível observar uma relação entre presença viral e manifestações clínicas da lesão.

Ainda não está claro na literatura, quais são as probabilidades e razões para um aumento maior da excreção oral dos herpesvírus em pacientes transplantados renais. No entanto, Kaufman et al.²³ estudando a excreção do HSV-1 na saliva e lágrima de pacientes normais, relataram que a excreção do vírus é claramente intermitente e que a probabilidade de detecção do DNA do HSV-1 é diretamente proporcional à duração do estudo e ao número de amostras coletadas. Nosso estudo realizou apenas uma única coleta de saliva em pacientes com diferentes períodos pós transplante. Portanto, é importante a realização de estudos prospectivos e com maior número de coletas para avaliação da excreção de herpesvírus em pacientes transplantados renais.

O presente estudo descreveu o perfil de excreção oral dos herpesvírus, em 50 pacientes transplantados renais. Os resultados deste estudo são importantes para outros pesquisadores, que procuram associar a excreção oral à presença clínica de lesões, principalmente como um potencial preditor de infecção pelos herpesvírus.

6.5 Conclusão

Os indivíduos transplantados renais excretaram herpesvírus com mais frequência do que os indivíduos controle, especialmente o HSV-1 e EBV. O sexo e a idade dos indivíduos transplantados não influenciaram na presença do vírus em sua saliva, sendo mais frequente a excreção oral dos herpesvírus em pacientes com transplante renal recente ($63,62 \pm 66,13$ meses).

REFERÊNCIAS

1. Gupta RK. Opportunistic infections in renal allograft recipients. *Transplant Proc.* 2007;39:731-3.
2. Meijers RW, Litjens NH, Hesselink DA, Langerak AW, Baan CC, Betjes MG. Primary Cytomegalovirus Infection Significantly Impacts Circulating T Cells in Kidney Transplant Recipients. *Am J Transplant.* 2015;15:3143-56.
3. Yalci A, Celebi ZK, Ozbas B, Sengezer OL, Unal H, Memikoğlu KO, Sengul S, Tuzuner A, Keven K. Evaluation of Infectious Complications in the First Year After Kidney Transplantation. *Transplant Proc.* 2015;47:1429-32 .
4. Brazilian Association of Organ Transplantation (2016) Numerical data on donation of organs and transplants performed by state and institution in the period: Jan / Jun 2016. <http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2016/1sem-RBT2016%20leitura.pdf>. Accessed 26 jan 2017.
5. Linares L, Cofán F, Cervera C, Ricart MJ, Oppenheimer F, Campistol JM, Moreno A. Infection-related mortality in a large cohort of renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 2007;39:2225-7.
6. Ak O, Yildirim M, Kucuk HF, Gencer S, Demir T. Infections in renal transplant patients: risk factors and infectious agents. *Transplant Proc.* 2013;45:944-8.
7. Gupta M, Diaz-Mitoma F, Feber J, Shaw L, Forget C, Filler G. Tissue HHV6 and 7 determination in pediatric solid organ recipients--a pilot study. *Pediatr Transplant.* 2003;7:458-63.
8. Al-Otaibi LM, Ngui SL, Scully CM, Porter SR, Teo CG. Salivary human herpesvirus 8 shedding in renal allograft recipients with Kaposi's sarcoma. *J Med Virol.* 2007;79:1357-65.
9. Al-Otaibi LM, Al-Sulaiman MH, Teo CG, Porter SR. Extensive oral shedding of human herpesvirus 8 in a renal allograft recipient. *Oral Microbiol Immunol.* 2009;24:109-15.
10. Le J, Gantt S. Human herpesvirus 6, 7 and 8 in solid organ transplantation. *Am J Transplant.* 2013;13:128-37.
11. Johnson G, Nelson S, Petric M, Tellier R. Comprehensive PCR-based assay for detection and species identification of human herpesviruses. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3274-9.
12. Nunes LA, Mussavira S, Bindhu OS. Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: a systematic review. *Biochem Med (Zagreb).* 2015;25:177-92.

13. Palmieri M, Martins VAO, Sumita LM, et al. Oral shedding of human herpesviruses in patients undergoing radiotherapy/chemotherapy treatment for head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Oral Investig*. 2017;21:2291-301.
14. Braz-Silva PH, Ortega KL, Rezende NP, Nunes FD, Magalhães MH. Detection of Epstein-Barr virus (EBV) in the oral mucosa of renal transplant patients. *Diagn Cytopathol*. 2006;34:24-8.
15. Al-Otaibi LM, Moles DR, Porter SR, Teo CG. Human herpesvirus 8 shedding in the mouth and blood of hemodialysis patients. *J Med Virol*. 2012;84:792-97
16. Baez CF, Guimarães MA, Martins RA, Zalona AC, Cossatis JJ, Zalis MG, Cavalcanti SM, Varella RB. Detection of Merkel cell polyomavirus in oral samples of renal transplant recipients without Merkel cell carcinoma. *J Med Virol*. 2013;85:2016-9.
17. Yamamoto Y, Morooka M, Hashimoto S, Ihra M, Yoshikawa T. Analysis of the shedding of three β -herpesviruses in urine and saliva of children with renal disease. *J Med Virol*. 2014;86:505-11.
18. Carratalà J, Montejo M, Pérez-Romero P. Infections caused by herpes viruses other than cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30:63-9.
19. Anastasopoulos NA, Duni A, Peschos D, Agnantis N, Dounousi E. The Spectrum of Infectious Diseases in Kidney Transplantation: A Review of the Classification, Pathogens and Clinical Manifestations. *In Vivo*. 2015;29:415-22.
20. Neumann AB, Daxbacher EL, Chiaratti FC, Jeunon T. Cutaneous involvement by cytomegalovirus in a renal transplant recipient as an indicator of severe systemic infection. *An Bras Dermatol*. 2016;91:80-3.
21. Beyari MM, Hodgson TA, Cook RD, Kondowe W, Molyneux EM, Scully CM, Teo CG, Porter SR. Multiple human herpesvirus-8 infection. *J Infect Dis*. 2003;188:678-89.
22. Carraro E, Granato CF. Single human cytomegalovirus gB genotype shed in multiple sites at the time of diagnosis in renal transplant recipients. *J Med Virol*. 2003;70:240-3.
23. Kaufman HE, Azcuy AM, Varnell ED, Sloop GD, Thompson HW, Hill JM. HSV-1 DNA in tears and saliva of normal adults. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46:241-7.
24. da Silva LM, Guimarães AL, Victória JM, Gomes CC, Gomez RS. Herpes simplex virus type 1 shedding in the oral cavity of seropositive patients. *Oral Dis*. 2005;11:13-6.
25. Lima RB, Santos PS, Malafronte P, Muller H, Caiaffa-Filho HH, Sens YA. Oral manifestation of cytomegalovirus associated with herpes simplex virus in renal transplant recipient. *Transplant Proc*. 2008;40:1378-81.
26. López-Pintor RM, Hernández G, de Arriba L, Morales JM, Jiménez C, de Andrés A. Oral ulcers during the course of cytomegalovirus infection in renal transplant recipients. *Transplant Proc*. 2009;41:2419-21.

27. Mustapic Z, Basic-Jukic N, Kes P, Lovcic V, Bubic-Filipi Lj, Mokos I, Kastelan Z, Zekan S. Varicella zoster infection in renal transplant recipients: prevalence, complications and outcome. *Kidney Blood Press Res.* 2011;34:382-6.
28. Netchiporouk E, Tchervenkov J, Paraskevas S, Sasseville D, Billick R. Evaluation of herpes simplex virus infection morbidity and mortality in pancreas and kidney-pancreas transplant recipients. *Transplant Proc.* 2013;45:3343-7.
29. Schmidt-Westhausen A, Gelderblom HR, Neuhaus P, Reichart PA. Epstein-Barr virus in lingual epithelium of liver transplant patients. *J Oral Pathol Med.* 1993;22:274-6.

Tabela 6.1 - Comparação entre excreção oral dos herpesvirus em pacientes transplantados renais e indivíduos imunocompetentes

Herpesvirus	Indivíduos		p
	Grupo de estudo n(%)	Controle n(%)	
Panherpes			
Positivo	47 (94.0)	43 (86.0)	0.182 ⁽¹⁾
Negativo	3 (6.0)	7 (14.0)	
HSV-1			
Positivo	9 (18.0)	2 (4.0)	0.025 ^{(1)*}
Negativo	41 (82.0)	48 (96.0)	
VZV (HHV-3)			
Positivo	2 (4.0)	0 (0.0)	0.495 ⁽²⁾
Negativo	48 (96.0)	50 (100.0)	
EBV (HHV-4)			
Positivo	25 (50.0)	14 (28.0)	0.024 ^{(1)*}
Negativo	25 (50.0)	36 (72.0)	
HHV-6A			
Positivo	0 (0.0)	1 (2.0)	1.000 ⁽²⁾
Negativo	50 (100.0)	49 (98.0)	
HHV-6B			
Positivo	4 (8.0)	1 (2.0)	0.362 ⁽²⁾
Negativo	46 (92.0)	49 (98.0)	
HHV-7			
Positivo	38 (76.0)	42 (84.0)	0.317 ⁽¹⁾
Negativo	12 (24.0)	8 (16.0)	
TOTAL	50 (100.0)	50 (100.0)	

As amostras (grupo estudo e controle) foram negativas para os vírus herpes simples - tipo 2 (HSV-2), citomegalovírus humano (CMV / HHV-5) e herpesvírus humano 8 (HHV-8).

*Significância estatística

(a) Teste qui-quadrado de Pearson

(b) Teste exato de Fisher

Fonte: O autor.

Tabela 6.2 - Associação entre gênero e excreção oral dos herpesvirus em pacientes transplantados renais

Herpesvirus	Gênero		p
	Homens n(%)	Mulheres n(%)	
Panherpes			
Positivo	21 (95.5)	26 (92.9)	1.00 ⁽¹⁾
Negativo	1 (4.5)	2 (7.1)	
HSV-1			
Positivo	6 (27.3)	3 (10.7)	0.157 ⁽¹⁾
Negativo	16 (72.7)	25 (89.3)	
VZV (HHV-3)			
Positivo	0 (0.0)	2 (7.1)	0.497 ⁽¹⁾
Negativo	22 (100.0)	26 (92.9)	
EBV (HHV-4)			
Positivo	11 (50.0)	14 (50.0)	1.000 ⁽²⁾
Negativo	11 (50.0)	14 (50.0)	
HHV-6B			
Positivo	2 (9.1)	2 (7.1)	1.000 ⁽¹⁾
Negativo	20 (90.9)	26 (92.9)	
HHV-7			
Positivo	15 (68.2)	23 (82.1)	0.251 ⁽²⁾
Negativo	7 (31.8)	5 (17.9)	
TOTAL	22 (100.0)	28 (100.0)	

As amostras foram negativas para os vírus herpes simples - tipo 2 (HSV-2), citomegalovírus humano (CMV / HHV-5) e herpesvírus humano 8 (HHV-8).

(1) Teste exato de Fisher

(2) Teste qui-quadrado de Pearson

*Significância estatística

Fonte: O autor.

Tabela 6.3 - Associação entre excreção oral dos herpesvírus e idade e meses pós transplante em pacientes transplantados renais

Herpesvirus	n	Idade		Meses pós transplante	
		Média±SD	p ^(a)	Média±SD	p ^(a)
Panherpes					
Positivo	47	49.15±12.88	0.563	63.62 ±66.13	0.055
Negativo	3	53.67±15.94		140.0 ±42.14	
HSV-1					
Positivo	9	48.22±17.88	0.820	41.67 ±50.88	0.194
Negativo	41	49.68±11.86		74.02 ±69.42	
VZV (HHV-3)					
Positivo	2	50.50±6.36	0.906	22.00 ±2.82	<0.001*
Negativo	48	49.38±13.18		70.13 ±67.91	
EBV (HHV-4)					
Positivo	25	50.48±13.95	0.568	70.40 ±64.46	0.820
Negativo	25	48.36±12.04		66.00 ±71.07	
HHV-6B					
Positivo	4	51.75±9.03	0.711	75.00 ±51.26	0.835
Negativo	46	49.22±13.28		67.61 ±68.82	
HHV-7					
Positivo	38	47.66±12.15	0.087	65.39 ±67.48	0.604
Negativo	12	55.00±14.28		77.08 ±68.39	

As amostras foram negativas para os vírus herpes simples - tipo 2 (HSV-2), citomegalovírus humano (CMV / HHV-5) e herpesvírus humano 8 (HHV-8).

SD desvio padrão

*Significância estatística

(a) Teste t de Student

Fonte: O autor.

7 CAPITULO V: EXCREÇÃO ORAL E VIREMIA DOS POLIOMAVIRUS EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAI

7.1 Introdução

Atualmente, os exames laboratoriais bioquímicos sanguíneos são a primeira escolha para acompanhamento e monitoramento de doenças. No entanto, a saliva tem sido sugerida como um excelente material de diagnóstico e monitoramento, principalmente pelo fato de que a coleta de saliva é uma técnica simples, indolor, de baixo custo e segura tanto para pacientes e como para a equipe médica. Além disso, a saliva é uma fonte de material que pode ser coletada várias vezes ao dia, sem prejuízo para o paciente.¹

O poliomavírus BK (BKPyV) tem uma alta prevalência de infecção latente na população saudável, no entanto, é capaz de causar disfunção renal por nefrite associada ao vírus BK, em pacientes transplantados renais, principalmente pelo fato desses pacientes estarem imunocomprometidos. A triagem para BKPyV geralmente revela virúria e/ou viremia, podendo progredir para doenças ativas.²⁻⁴

Os pacientes transplantados renais precisam de cuidados e atenção especiais no acompanhamento pós transplante. O tratamento imunossupressor é essencial para a manutenção do transplante renal, mas influencia negativamente o equilíbrio entre a replicação viral e a resposta imune celular. Isso leva a um risco potencial de infecções primárias ou reativações oportunistas.^{4,5} O BKPyV causa 95% dos casos de nefropatia relacionados ao poliomavírus, sendo os 5% restantes causados pelo vírus JC. A nefropatia prejudica a função do enxerto, causando falha prematura do mesmo em 1% a 10% dos pacientes com transplante de rim.⁶

Considerando que o BKPyV permanece latente no tecido renal, os receptores de transplante renal são monitorados com grande interesse para a detecção do vírus, a fim de evitar doenças clínicas ativas. O diagnóstico precoce e a recuperação imunológica são essenciais para evitar a rejeição do transplante nesses pacientes. A triagem não invasiva pode facilitar a detecção de novos casos e monitorar casos previamente conhecidos.^{2,6-8} Assim, é importante conhecer o perfil da excreção oral

do BKPyV nesses pacientes e entender a importância clínica dessa excreção salivar. O objetivo desta pesquisa foi verificar a presença de BKPyV na saliva de pacientes transplantados renais e correlacionar com a viremia.

7.2 Materiais e Métodos

7.2.1 Delineamento e Estudo Populacional

Foi realizado um estudo transversal em que os participantes fizeram parte de uma amostra de conveniência da Unidade de Transplante de Rim do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), São Paulo/SP, Brasil. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa local, de acordo com o protocolo número 0234/10 (Anexo D), com todos os participantes assinando um termo de consentimento livre e esclarecido.

Os dados demográficos foram coletados, incluindo informações sobre sexo, idade e período pós-transplante no momento da coleta de dados. Os critérios de inclusão foram: ter idade superior a 18 anos, ter realizado apenas transplante renal, independentemente do tempo pós-transplante. Enquanto os critérios de exclusão foram: o uso de medicamentos antivirais nos últimos três meses antes da coleta das amostras, serem soropositivos para o HIV ou ter sido submetidos a transplante multi-visceral.

A população do estudo envolveu 126 receptores de transplante renal, em que foi coletado 126 amostras de saliva e 52 amostras de sangue (somente dos pacientes que consentiram a coleta de sangue). Todos os tipos de amostras foram coletados no mesmo momento. Aproximadamente 3ml de saliva não estimulada foram coletados em um tubo Falcon de 50ml usando o método de drenagem, com a coleta de primeiro minuto sendo descartada. Cinco mililitros de sangue foram coletados e colocados em um tubo contendo fator de coagulação. As alíquotas da amostra de sangue foram separadas para análise de BKPyV. Todas as amostras foram armazenadas a - 80°C.

7.2.2 Extração e quantificação de DNA usando PCR *real-time*

A detecção e quantificação do BKPyV foram realizadas por PCR *real-time*, sendo realizados os procedimentos laboratoriais no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMT - USP). A extração do DNA^{2,3} foi realizada usando o kit QIAGEN QIAamp, de acordo com especificações do fabricante. Na PCR foram usados primers e sondas específicas para detectar o gene que codifica a proteína Ag-T do BKPyV, resultando em 1 fragmento de 80 pb (*forward*: 5-GAAACTGAAGACTCTGGACATGGA-3; *reverse*: 5-GGCTGAAGTATCTGAGACTTGGG-3; BKPyV marcador: CAAGCACTGAATCCCAATCACAATGCTC).⁹

As sondas de reação foram marcadas com FAM (6-carboxifluoresceína) como um corante iniciador na extremidade 5' e com TAMRA (6-carboxi-tetrametil-rodamina) como um marcador na extremidade 3'. A reação final foi preparada com 12,5µl de TaqMan Universal PCR Master Mix (2x) (Biosystems® Aplicada), 0,5µl de cada iniciador (10µM), 0,5µl de sonda (5µM) e 6µl de água DEPC. Os parâmetros de reação foram 2min a 50°C e 10min a 95°C, seguidos de 45 ciclos (15s a 95°C e 1min a 60°C) em termociclador ABI 7300 (Applied Biosystems®). Um padrão plasmático contendo a grande região de codificação do antígeno T foi usado como controle para determinar o número de cópias por mililitro (cp/ml) na reação final. O protocolo empregado possui uma alta sensibilidade analítica na reação final, com uma detecção de 1000 cópias *por* mililitro (cp/ml) de sangue.

7.2.3 Análise estatística

Para comparação da presença de BKPyV no sangue e na saliva, foi utilizado o teste da proporção binomial. As variáveis “tempo pós-transplante” e “quantificação de BKPyV na saliva e no sangue” não apresentaram distribuição normal (Kolmogorov-Smirnov, $p < 0,001$). Para verificar as associações entre a excreção salivar do BKPyV e os períodos pós-transplante (em meses), foi utilizado o teste de Mann-

Whitney. A correlação de Spearman foi utilizada para correlacionar a carga viral na saliva e no sangue dos receptores de transplante renal. Os dados resultantes foram analisados usando o software SPSS 17.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, EUA). Todos os testes foram realizados considerando um nível de significância de 0,05.

7.3 Resultados

A idade média dos participantes foi de $51,11 \pm 12,45$ anos, dos quais 69 (54,8%) eram do sexo masculino e 57 (45,2%) do sexo feminino. O tempo médio pós-transplante renal foi de $4,80 \pm 6,04$ meses. O BKPyV foi quantificado nas 126 amostras de saliva, com média de $4,761 \pm 11,105$ cp/ml (mínimo=63; máximo=55,241, mediana=1,108) e em 52 amostras de sangue, com média de $93,04 \pm 364,227$ cp/ml (mínimo=80; máximo=1459,398, mediana=1,255). As amostras de sangue mostram uma quantificação viral superiores de saliva. Apenas 16/52 (30,8%) participantes apresentaram BKPyV no sangue, enquanto 59/126 (46,8%) excretaram o vírus na saliva ($p = 0,004$) (Tabela 7.1). A excreção do BKPyV foi encontrada em pacientes com período pós-transplante mais curto ($3,86 \pm 5,25$, $p = 0,103$) (Tabela 7.2).

Cinquenta e dois pacientes apresentaram amostras pareadas de sangue e saliva, desses participantes, apenas 11 (21,1%) apresentavam viremia e excreção salivar do BKPyV ao mesmo tempo. Entre os 52 participantes, a média da carga viral na saliva foi $1,079 \pm 2,916$ cp/ml e no sangue foi de $28,801 \pm 202,289$. Ao correlacionarmos a carga viral na saliva e no sangue dessas amostras, observamos uma fraca correlação entre a excreção salivar e viremia do BKPyV. (Correlação de Spearman = 0,193, $p = 0,170$).

7.4 Discussão

O BKPyV é frequentemente reativado em pacientes transplantados renais devido à imunossupressão. Na urina, o BKPyV tem uma prevalência entre 20,4% e 40 %^{7,8,10-12}, com a virúria do BKPyV sendo detectada em 4-5% dos transplantados renais. O monitoramento do BKPyV por PCR nas amostras de urina e sangue é um método benéfico e rápido para a prevenção de complicações renais durante o acompanhamento de pacientes transplantados renais.^{10,13-14}

Os fluidos orais (ex: saliva) têm apresentado alta prevalência de BKPyV, com detecção igualmente eficiente em comparação com a urina e o sangue.² Além disso, a saliva contém muitos marcadores biológicos que também podem ser detectados em exames de urina ou sangue, dessa forma, os fluidos salivares podem ser utilizados para a detecção e monitoramento de diversas doenças com a mesma eficácia desses outros fluidos corporais.^{1,15}

Embora a saliva seja um potencial material para diagnóstico, ela também é um importante meio de contaminação a ser considerado, em pacientes transplantados renais. Estudos demonstraram que a prevalência do BKPyV na saliva desses pacientes atinge 91,7%², e esse vírus também pode ser detectado na saliva de pacientes HIV positivos.¹⁶ Os fluidos orais apresentam alta prevalência do BKPyV e são igualmente eficientes em comparação com a urina e o sangue. Quando fluidos orais são usados em ensaios de triagem para a detecção de poliomavírus, os resultados são altamente positivos e são especialmente indicados em pacientes que não conseguem urinar. Essa positividade nos fluidos orais ocorre mesmo quando o paciente apresenta viremia negativa, o que indica que a saliva pode ser um meio de detecção precoce do BKPyV.^{2,3}

Em nosso estudo, 46,8% dos participantes excretaram o vírus nos fluidos orais, sendo um percentual menor do que o observado na literatura. Doenças relacionadas ao BKPyV podem estar associadas com uma deficiência imunológica específica como resultado do uso de drogas imunossupressoras.^{3,17}

O BKPyV foi detectado em fluidos orais e infecções orais, com sua replicação ocorrendo *in vitro* em células da glândula salivar, o que justifica a presença de BKPyV na saliva.¹⁸ Os nossos resultados corroboram com os descritos na

literatura, principalmente porque a presença de BKPyV na saliva dos transplantados renais é significativamente maior do que no sangue.

Em nosso estudo, as cargas virais foram maiores no sangue ($93,604 \pm 364,227$ cp/ml) do que na saliva ($4,761 \pm 11,105$ cp/ml). Apesar da presença de valores discrepantes, acreditamos haver fortes indicações de que existem diferenças na quantificação entre saliva e sangue, significando que outros estudos devem ser conduzidos para confirmar essa hipótese. Um aumento da replicação do BKPyV ocorre em pacientes imunossuprimidos, resultando na destruição de células uroepiteliais infectadas e no aumento de células imunes inflamatórias.¹⁹ Em transplantados renais, essa destruição afeta 5 a 8% dos pacientes, e é chamada de nefropatia associada ao BKPyV, que pode resultar na perda do enxerto.^{18,20,21} Nesse sentido, a saliva pode ser útil para a detecção de níveis virais predisponentes ao desenvolvimento desse tipo de nefropatia, porém nossos resultados demonstram que a saliva não é confiável para essa avaliação. Portanto, estudos clínicos e prospectivos são necessários para confirmar esta hipótese.

Uma fraca correlação entre a quantificação viral na saliva e no sangue foi observada em nosso estudo, mostrando dois compartimentos independentes de replicação do BKPyV. Um estudo recente sobre a expressão do miRNA de poliomavirus na saliva, mostrou que a cavidade oral é uma região de infecção persistente por BKPyV, quando comparada com o plasma. O fato de não haver concordância, implica que a substituição dos testes tradicionais usados com amostras de sangue e urina não é recomendada. No entanto o uso de fluídos orais concomitantemente com outros fluídos aumenta o mapeamento e é útil como um teste complementar para detectar os poliomavirus. Embora este estudo sugira que a excreção salivar do BKPyV não se correlaciona com a doença ativa, uma das limitações do presente estudo foi que não procuramos associar a doença ativa a excreção salivar de BKPyV. Dessa forma, estudos clínicos com métodos semelhantes são sugeridos em pacientes transplantados renais com doença ativa.

A excreção do BKPyV foi encontrada em pacientes com período pós-transplante mais curto, mas sem significância estatística. No entanto, esse resultado é consistente com o conceito de que infecções em pacientes transplantados renais são mais comuns nos primeiros meses após o transplante, quando apresentam máxima imunossupressão.^{5,22-23}

Bochechos com Listerine® tem sido usado como um método alternativo para coletar saliva sendo eficaz na preservação viral para análise por *real-time* PCR. Um estudo mostrou alta frequência de detecção e quantificação de BKPyV com lavado bucal (23 de 46 indivíduos), sugerindo que esse método é uma boa alternativa para detecção e monitoramento desse vírus.² Nosso estudo utilizou o método de coleta de saliva não estimulada e os resultados foram semelhantes à aqueles com bochechos com Listerine®, considerando à análise por *real-time* PCR. Esses resultados sugerem que a forma de coleta da saliva não influencia a análise laboratorial do BKPyV.

7.5 Conclusão

Em conclusão, O BKPyV foi mais frequentemente encontrado na saliva do que no sangue, de pacientes transplantados renais, especialmente em pacientes recentemente transplantados. Foi observada uma fraca correlação entre excreção salivar e viremia. Portanto, o presente estudo sugere que, embora seja observada maior excreção do BKPyV na saliva do que no sangue, não há correlação confiável entre excreção salivar e viremia, mostrando dois compartimentos diferentes de replicação viral.

REFERÊNCIAS

1. Chojnowska S, Baran T, Wilińska I, Sienicka P, Cabaj-Wiater I, Knaś M. Human saliva as a diagnostic material. *Adv Med Sci.* 2018;63:185-91.
2. Castro T, Fink MC, Figueiredo M, Braz-Silva PH, Pannuti CM, Ortega KL, Gallottini M. Polyomavirus BK and JC in individuals with chronic kidney failure, kidney transplantation, and healthy controls. *J Clin Virol.* 2017;89:5-9.
3. Figueiredo MA, Domingues Fink MC, Castro T, Braz-Silva PH, Steffens JC, Eduardo FP, Gallottini M, Ortega KL. Detection of human polyomaviruses JC and BK in liver pretransplant patients. *Oral Dis.* 2017;23:1127-33.
4. Scadden JR, Sharif A, Skordilis K, Borrows R. Polyoma virus nephropathy in kidney transplantation. *World J Transplant.* 2017;7:329-38.
5. Yalci A, Celebi ZK, Ozbas B, Sengezer OL, Unal H, Memikoğlu KO, Sengul S, Tuzuner A, Keven K. Evaluation of Infectious Complications in the First Year After Kidney Transplantation. *Transplant Proc.* 2015;47:1429-32.
6. Gonzalez S, Escobar-Serna DP, Suarez O, Benavides X, Escobar-Serna JF, Lozano E. BK Virus Nephropathy in Kidney Transplantation: An Approach Proposal and Update on Risk Factors, Diagnosis, and Treatment. *Transplant Proc.* 2015;47:1777-85.
7. Pires EP, Bernardino-Vallinoto CV, Alves DM, Migone SR, Machado LF, Ishak MO, Ishak R, Cayres-Vallinoto IM, Vallinoto AC. Prevalence of infection by JC and BK polyomaviruses in kidney transplant recipients and patients with chronic renal disease. *Transpl Infect Dis.* 2011;13:633-7.
8. Funahashi Y, Kato M, Fujita T, Takai S, Kimura Y, Gotoh M. Prevalence of polyomavirus positivity in urine after renal transplantation. *Transplant Proc.* 2014;46:564-6.
9. Pal A, Sirota L, Maudru T, Peden K, Lewis AM Jr. Real-time, quantitative PCR assays for the detection of virus-specific DNA in samples with mixed populations of polyomaviruses. *J Virol Methods.* 2006;135:32-42.
10. Hsieh MC, Hung CW, Chiou HL, Yang SF. Effect of a BK viruria reaction detected by qualitative polymerase chain reaction on the renal function of kidney transplant recipients. *Mol Med Rep.* 2013;7:1319-23.
11. Saundh BK, Tibble S, Baker R, Sasnauskas K, Harris M, Hale A. Different patterns of BK and JC polyomavirus reactivation following renal transplantation. *J Clin Pathol.* 2010;63:714-8.
12. Boukoum H, Nahdi I, Sahtout W, Skiri H, Segondy M, Aouni M. BK and JC virus infections in healthy patients compared to kidney transplant recipients in Tunisia. *Microb Pathog.* 2016;97:204-8.

13. Hu J, Zhao H, Huang Y, Zhang X, Gao H, Yang M, Fan J, Ma W. Prospective study of posttransplant polyomavirus infection in renal transplant recipients. *Exp Clin Transplant*. 2011;9:175-80.
14. Bassil N, Rostaing L, Mengelle C, Kallab S, Esposito L, Guitard J, Cardeau-Desangles I, Weclawiak H, Izopet J, Kamar N. Prospective monitoring of cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, BK virus, and JC virus infections on belatacept therapy after a kidney transplant. *Exp Clin Transplant*. 2014;12:212-9.
15. Nunes LA, Mussavira S, Bindhu OS. Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: a systematic review. *Biochem Med. (Zagreb)*. 2015 5;25:177-92.
16. Robaina TF, Mendes GS, Benati FJ, Pena GA, Silva RC, Montes MA, Otero R, Castro GF, Câmara FP, Santos N. Polyomavirus in saliva of HIV-infected children, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2013;19:155-7.
17. Jiang M, Abend JR, Johnson SF, Imperiale MJ. The role of polyomaviruses in human disease. *Virology*. 2009;384:266-73.
18. Jeffers LK, Madden V, Webster-Cyriaque J. BK virus has tropism for human salivary gland cells in vitro: implications for transmission. *Virology*. 2009;394:183-93
19. Hirsch HH. Polyomavirus BK nephropathy: a (re-)emerging complication in renal transplantation. *Am J Transplant*. 2002;2:25-30.
20. Nickeleit V, Klimkait T, Binet IF, Dalquen P, Del Zenero V, Thiel G, Mihatsch MJ, Hirsch HH. Testing for polyomavirus type BK DNA in plasma to identify renal-allograft recipients with viral nephropathy. *N Engl J Med*. 2000;342:1309-15.
21. Dugan AS, Eash S, Atwood WJ. Update on BK virus entry and intracellular trafficking. *Transpl Infect Dis*. 2006;8:62-7.
22. Martelli F, Mencarini J, Rocca A, Malva ND, Bartolozzi D, Gianecchini S. Polyomavirus microRNA in saliva reveals persistent infectious status in the oral cavity. *Virus Res*. 2018;249:1-7.
23. Anastasopoulos NA, Duni A, Peschos D, Agnantis N, Dounousi E. The Spectrum of Infectious Diseases in Kidney Transplantation: A Review of the Classification, Pathogens and Clinical Manifestations. *In Vivo*. 2015;29:415-22.

Tabela 7.1 - Detecção e prevalência do BKPyV nas amostras de sangue e saliva.

BKPyV / Amostras	N	%	Prevalência	p
SANGUE				
Positivas	16	30.8	30.8%	0.004*
Negativas	36	69.2		
TOTAL¹	52	100		
SALIVA				
Positivas	59	46.8	46.8%	
Negativas	67	53.2		
TOTAL	126	100		

¹ 52 pacientes apresentaram amostras de sangue

* Teste de proporção binomial, resultados estatisticamente significantes

Fonte: O autor.

Tabela 7.2 - Relação entre excreção oral do BKPyV e tempo pos-transplante

	n	%	Tempo Pos-transplante (meses) Média ± DP	p
BKPyV na saliva	59	47.2	3.86±5.25	0.103 ¹
	66	52.8	5.64±6.60	

DP: desvio padrão

¹ Mann-Whitney

*Um paciente não apresentou informações sobre o tempo pós transplante.

Fonte: O autor.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através desse estudo, em relação à excreção oral de diferentes vírus nos 3 grupos de pacientes imunocomprometidos, podemos concluir:

I - Pacientes submetidos a radio/quimioterapia são afetados por complicações orais agudas que podem levar a alterações na cavidade oral, afetando a qualidade de vida do paciente. Compreender o curso natural das complicações orais agudas é importante para informar os pacientes sobre a importância de manter uma saúde bucal adequada, buscando minimizar os sintomas das complicações. Desenvolver melhores estratégias para tratar esses sintomas pode ajudar a melhorar a qualidade de vida em pacientes submetidos à radio/quimioterapia para tratamento de tumores em região de cabeça e pescoço futuramente.

II - A excreção oral dos herpesvirus humanos não é afetada pela presença de xerostomia, uma vez que houve uma progressão em relação à excreção de herpesvírus, mesmo com a evolução da xerostomia, sugerindo uma replicação viral local na cavidade oral não sendo completamente dependente da excreção salivar.

III - Na população brasileira imunologicamente controlada, a excreção oral do HHV-8 foi limitada a homens soropositivos para o HHV-8, ocorrendo de maneira infrequente e intermitente, e não estava associada à viremia por HHV-8, sugerindo um potencial limitado para transmissão oral ou sanguínea.

IV - Os indivíduos transplantados renais excretaram herpesvírus com mais frequência do que os indivíduos controle, especialmente o HSV-1 e EBV. O sexo e a idade dos indivíduos transplantados não influenciaram na presença do vírus na saliva, sendo mais frequente a excreção oral dos herpesvírus em pacientes com transplante renal recente.

V - O BKPyV foi mais frequentemente encontrado na saliva do que no sangue, de pacientes transplantados renais, especialmente em pacientes recentemente transplantados. Foi observada uma fraca correlação entre excreção salivar e

viremia. Portanto, o presente estudo sugere que, embora seja observada maior excreção do BKPyV na saliva, não há correlação confiável entre excreção salivar e viremia, mostrando dois compartimentos diferentes de replicação viral.

REFERÊNCIA¹

1. Halperin EC, Perez CA, Brady LW. The Discipline of Radiation Oncology. Principles and Practice of Radiation Oncology. Philadelphia (PA): Lippincott Williams & Wilkins; 2004:4,6,10
2. Bhide SA, Nutting CM. Advances in radiotherapy for head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2010;46:439-41.
3. Johansson J, Blomquist E, Montelius A, et al. Potential outcomes of modalities and techniques in radiotherapy for patients with hypopharyngeal carcinoma. *Radiother Oncol.* 2004;72:129-38.
4. Fang FM, Chien CY, Tsai WL, et al. Quality of life and survival outcome for patients with nasopharyngeal carcinoma receiving three-dimensional conformal radiotherapy vs. intensity-modulated radiotherapy-a longitudinal study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2008;72:356-64.
5. Mosel DD, Bauer RL, Lynch DP, et al. Oral Complications in treatment of cancer patients. *Oral Diseases.* 2011;17:550-9.
6. Palmieri M, Martins VA, Sumita LM, et al. Oral shedding of human herpesviruses in patients undergoing radiotherapy/chemotherapy treatment for head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Oral Investig.* 2017;21:2291–301.
7. Correia AVL, Coelho MRCD, de Oliveira Mendes Cahú, et al. Seroprevalence of HSV1-2 and correlation with aggravation of oral mucositis in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck region submitted to antineoplastic treatment. *Support Care Cancer.* 2015;23:2105-11.
8. de Santana Sarmiento DJ, Tozetto-Mendoza TR, Masami Sumita L, et al. Oral shedding of human herpesviruses in renal transplant patients. *Clin Oral Investig.* 2018;22:885-91.
9. Sonis ST, Elting LS, Keefe D, et al. Perspectives on Cancer Therapy-Induced Mucosal Injury- pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. *Cancer Supp.* 2004;100:1995-2025.
10. Johnson G, Nelson S, Petric M, Tellier R. Comprehensive PCR-based assay for detection and species identification of human herpesviruses. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3274-9

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

11. Palmieri M, Ornaghi M, Martins VAO, et al. Oral shedding of human herpesviruses in patients undergoing radiotherapy/chemotherapy for head and neck squamous cell carcinoma is not affected by xerostomia. *J Oral Microbiol.* 2018 May 28;10:1476643.
12. Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligoj B, Buttò S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanita.* 2010;46:5-14.
13. Vitale F, Viviano E, Perna AM, et al. Serological and virological evidence of non-sexual transmission of human herpesvirus type 8 (HHV8). *Epidemiol Infect.* 2000; 125: 671-5.
14. Pauk J, Huang ML, Brodie SJ, et al. Mucosal Shedding of human herpesvirus 8 in men. *N Engl J Med.* 2000;343:1369-77.
15. Taylor MM, Chohan B, Lavreys L, et al. Shedding of human herpesvirus 8 in oral and genital secretions from HIV-1-seropositive and –seronegative Kenyan Women *J Infect Dis.* 2004;190:484-8.
16. Widmer IC, Erb P, Grob H, et al. Human herpesvirus 8 oral shedding in HIV-infected men with and without Kaposi Sarcoma. *Acquiring Immune Defic Syndr.* 2006;42: 420-425.
17. Casper C, Redman M, Huang ML, et al. HIV infection and human herpesvirus-8 oral shedding among men who have sex with men. *Acquiring Immune Defic Syndr.* 2004;35:233–8.
18. Bender Ignacio RA, Goldman JD, Magaret AS, et al. Patterns of human herpesvirus-8 oral shedding among diverse cohorts of human herpesvirus-8 seropositive persons. *Infect Agent Cancer.* 2016;11:7.
19. Tozetto-Mendoza TR, Sumita LM, Palmieri M, et al. No detectable human herpesvirus-8 oral shedding in seronegative-healthy, immunocompetent tent individuals from non-endemic regions for Kaposi's sarcoma: A pilot study. *J Invest Clin Dent.* 2018;9:e12278.
20. Gupta RK. Opportunistic infections in renal allograft recipients. *Transplant Proc.* 2007;39:731-3
21. Yalci A, Celebi ZK, Ozbas B, et al. Evaluation of Infectious Complications in the First Year After Kidney Transplantation. *Transplant Proc.* 2015;47:1429-32
22. Linares L, Cofán F, Cervera C, et al. A. Infection-related mortality in a large cohort of renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 2007;39:2225-7

23. Ak O, Yildirim M, Kucuk HF, et al. Infections in renal transplant patients: risk factors and infectious agents. *Transplant Proc.* 2013;45:944-8.
24. Anastasopoulos NA, Duni A, Peschos D, et al. The Spectrum of Infectious Diseases in Kidney Transplantation: A Review of the Classification, Pathogens and Clinical Manifestations. *In Vivo* 2015;29:415-22.
25. Scadden JR, Sharif A, Skordilis K, et al. Polyoma virus nephropathy in kidney transplantation. *World J Transplant.* 2017;7:329-38.
26. Al-Otaibi LM, Al-Sulaiman MH, Teo CG, et al. Extensive oral shedding of human herpesvirus 8 in a renal allograft recipient. *Oral Microbiol Immunol.* 2009;24:109-15.
27. Pires EP, Bernardino-Vallinoto CV, Alves DM, et al. Prevalence of infection by JC and BK polyomaviruses in kidney transplant recipients and patients with chronic renal disease. *Transpl Infect Dis.* 2011;13:633-7.
28. Hu J, Zhao H, Huang Y, et al. Prospective study of posttransplant polyomavirus infection in renal transplant recipients. *Exp Clin Transplant.* 2011;9:175-80.
29. Bassil N, Rostaing L, Mengelle C, et al. Prospective monitoring of cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, BK virus, and JC virus infection on belatacept therapy after a kidney transplant. *Exp Clin Transplant.* 2014;12:212-9.
30. Castro T, Fink MC, Figueiredo M, et al. Polyomavirus BK and JC in individuals with chronic kidney failure, kidney transplantation, and healthy controls. *J Clin Virol.* 2017;89:5-9.
31. Gonzalez S, Escobar-Serna DP, Suarez O, et al. BK Virus Nephropathy in Kidney Transplantation: An Approach Proposal and Update on Risk Factors, Diagnosis, and Treatment. *Transplant Proc.* 2015;47:1777-85.

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DETECÇÃO DOS VÍRUS DA FAMÍLIA Herpesviridae NA MUCOSA BUCAL DE PACIENTES IRRADIADOS PARA TRATAMENTO DE CARCINOMA ESPINOCELULAR DE CABEÇA E PESCOÇO

Pesquisador: Thaís Bianca Brandão

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 37922114.9.0000.0065

Instituição Proponente: FUNDACAO FACULDADE DE MEDICINA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 910.924

Data da Relatoria: 04/11/2014

Apresentação do Projeto:

Estudo descritivo onde pretende-se colher amostras de saliva de 20 pacientes que receberam radioterapia para avaliar a prevalência de vírus da família herpes.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a excreção oral dos herpes vírus humano (HSV- 1, HSV – 2, EBV, CMV, VZV, HH6, HHV7 e HHV8) e sua possível associação com osurgimento e o desenvolvimento da mucosite bucal em pacientes sob tratamento radioterápico de carcinoma espinocelular (CEC) de boca e orofaringe.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Apenas o desconforto de um bochecho com solução antisséptica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

nenhum

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

adequado

Recomendações:

nenhuma

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36
Bairro: PACAEMBU **CEP:** 01.246-903
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401 **E-mail:** cep.fm@usp.br

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 910.924

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado

SAO PAULO, 12 de Dezembro de 2014

Assinado por:
Roger Chammas
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36
Bairro: PACAEMBU **CEP:** 01.246-903
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401 **E-mail:** cep.fm@usp.br

ANEXO B - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Dinâmica da excreção oral e viremia do herpesvírus 8 humano (HHV-8) em indivíduos HIV positivos e negativos

Pesquisador: Claudio Sérgio Pannuti

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 06888612.0.0000.0065

Instituição Proponente: INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 171.909

Data da Relatoria: 12/12/2012

Apresentação do Projeto:

O projeto já foi analisado anteriormente e foi considerado adequado e sem pendências

Objetivo da Pesquisa:

Conforme parecer já aprovado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforma parecer já aprovado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme parecer já aprovado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi apresentada nova versão do TCLE, visando futura utilização das amostras de sangue e saliva em outras situações, desde que haja concordância dos sujeitos de pesquisa e aprovação do CEP e da CONEP, se for necessário. A redação do TCLE é clara e mostra-se adequada.

Recomendações:

Sugiro aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: DOUTOR ARNALDO 455

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3061-8004

E-mail: cep.fmusp@hcnet.usp.br

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP



Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado

SAO PAULO, 13 de Dezembro de 2012

Assinador por:
Paulo Euripedes Marchiori
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR ARNALDO 455

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3061-8004

E-mail: cep.fmusp@hcnet.usp.br

ANEXO C - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Comparação da variabilidade do Herpesvírus Humano do tipo 8 (HHV-8) entre grupos de indivíduos infectados por HIV sem e com Sarcoma de Kaposi associado à AIDS.

Pesquisador: Tania Regina Tozetto Mendoza

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 55771116.0.1001.0065

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.604.799

Apresentação do Projeto:

O projeto descreve estudo transversal que é parte de projeto previamente aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq, 290/2011). Sua hipótese se ampara no seguinte tripé científico: 1. recente identificação do Herpesvirus Humano do tipo 8 (HHV-8) como o agente etiológico de todas as formas clínico-epidemiológicas do sarcoma de Kaposi (SK); 2. apesar de SK ser comum em AIDS, nem todo o paciente com HHV-8 e AIDS desenvolve SK; e 3. alguns alvos do genoma viral, como a ORF K1 e a região codificadora de microRNA do HHV-8, são reconhecidos estreitamente nos processos de tumorigênese, e as variações nesses alvos podem ser considerados como potenciais fatores de virulência. Portanto, esta considera a existência de variações genéticas do HHV-8 que podem ser relacionadas ao desenvolvimento do SK-AIDS, ao lado dos fatores de predisposição do hospedeiro. A hipótese tem valor científico, pois pode contribuir com dados de interesse clínico e que ainda parecem escassos na literatura. O método proposto para testá-la é adequado.

Objetivo da Pesquisa:

Comparar os perfis de variantes da ORF K1 e de polimorfismos em regiões codificadoras de miRNA do Herpesvirus Humano do tipo 8 intra e inter indivíduos infectados por HIV com e sem Sarcoma de Kaposi.

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 1.604.799

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O estudo implica em risco e desconforto mínimos (incômodo e eventual aparecimento de hematoma, decorrentes de coleta única de sangue). Essa informação foi devidamente acrescida ao TCLE. Não existe benefício direto ao sujeito de pesquisa, mas os dados obtidos podem ter aplicação clínica em médio prazo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa tem como tema um assunto de interesse clínico/científico. Ela se utiliza de amostras de pacientes com AIDS e sem SK que apresentam DNA de HHV-8 salivar (n=104), obtidas em estudo prévio, e prevê a inclusão de mais aproximadamente 52 pacientes com AIDS e SK (estimando uma frequência de 74% de material genético viral adequado para as análises, para completar 38 pacientes). A metodologia proposta é sofisticada e adequada para atender as ambições do estudo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos obrigatórios estão adequados, incluindo a nova versão do TCLE. De acordo com o pesquisador responsável, o estudo será desenvolvido com recursos próprios. Além disso, recursos complementares serão solicitados à Fapesp. Desconsidera-se, portanto, a informação contida no documento "Informações Básicas do Projeto" de que a USP seria patrocinadora do estudo. De acordo com a pesquisadora responsável, existe anuência prévia para uso das amostras armazenadas. Na atual submissão, esta esclarece que a dispensa de TCLE para o uso de amostras coletadas em estudo anterior se ampara no fato de que todas as análises previstas no estudo presentemente proposto foram previamente autorizadas pelos sujeitos de pesquisa, ainda que para responder uma pergunta distinta da atual. A referida pesquisadora garante o uso sigiloso dos dados e incluiu, nesta submissão, carta de anuência do patrocinador principal assinada pela chefia do laboratório de Virologia e pela diretoria do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo. Na referida carta informa-se a disponibilidade de infraestrutura adequada do laboratório para a condução do estudo presentemente proposto.

Recomendações:

Enviar artigo com divulgação dos dados obtidos no presente estudo, ao seu término.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A justificativa para dispensa de TCLE é adequada e não há mais questões de ordem ética que impeçam o início imediato do estudo.

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 1.604.799

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_662515.pdf	14/06/2016 16:40:30		Aceito
Declaração de Pesquisadores	070616respostaoparecer.docx	14/06/2016 16:37:35	Tania Regina Tozetto Mendoza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	v1DispensaTCLE.docx	14/06/2016 14:23:13	Tania Regina Tozetto Mendoza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	dispensaTCLE.pdf	13/06/2016 16:10:58	Tania Regina Tozetto Mendoza	Aceito
Declaração do Patrocinador	anuenciapatroc.pdf	13/06/2016 16:09:44	Tania Regina Tozetto Mendoza	Aceito
Outros	anuencia.pdf	17/05/2016 18:05:46	Tania Regina Tozetto Mendoza	Aceito
Outros	pdfrespostaoparecer.pdf	17/05/2016 18:01:46	Tania Regina Tozetto Mendoza	Aceito
Outros	anexo2anuencia.pdf	28/04/2016 09:11:32	Tania Regina Tozetto Mendoza	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	infraestrut.doc	28/04/2016 09:09:16	Tania Regina Tozetto Mendoza	Aceito
Parecer Anterior	aprovacao029011.pdf	27/04/2016 23:13:55	Tania Regina Tozetto Mendoza	Aceito
Folha de Rosto	folharostohhv8.pdf	26/04/2016 10:09:03	Tania Regina Tozetto Mendoza	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	pdf2016TozettoMendoza.pdf	07/04/2016 10:15:09	Tania Regina Tozetto Mendoza	Aceito
Outros	Figura1IIER.jpg	07/04/2016 10:13:55	Tania Regina Tozetto Mendoza	Aceito
Brochura Pesquisa	pdfmicroRNA0504cas.pdf	05/04/2016 16:46:57	Tania Regina Tozetto Mendoza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Anexo3tcle.pdf	05/04/2016 14:37:58	Tania Regina Tozetto Mendoza	Aceito
Orçamento	Anexo1provisao.pdf	05/04/2016 14:36:12	Tania Regina Tozetto Mendoza	Aceito
Cronograma	Quadro1cronogramasnps.pdf	05/04/2016 14:32:45	Tania Regina Tozetto Mendoza	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36
Bairro: PACAEMBU CEP: 01.246-903
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401 E-mail: cep.fm@usp.br

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 1.604.799

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 22 de Junho de 2016

Assinado por:
Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br



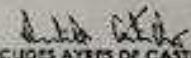
APROVAÇÃO


A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 25/05/2011, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 0290/11, intitulado: "VARIABILIDADE GENÉTICA DO HEPERVIRUS B HUMANO (HHV8) E EVOLUÇÃO CLÍNICA DO SARCOMA DE KAPOSI ASSOCIADO A AIDS, COMPARAÇÃO COM GENOTIPOS DE HHV8 DE PACIENTES INFECTADOS POR HIV SEM SK, E NÃO INFECTADOS POR HIV TRANSPLANTADOS RENAIS," apresentado pelo Departamento de MOLÉSTIAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os esclarecimentos parciais e finais sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso DC2, letra "a").

Pesquisador (a) Responsável: Vanda Akiko Ueda Iick de Souza
 Pesquisador (a) Titular: Tania Regina Tozetto Mendota
 Co-autores: Cláudio Sérgio Fereuil, Lígia Camero Menoff

CAPPesq, 25 de Maio de 2011


 PROF. DR. EUCIDES AYRES DE CASTILHO
 Coordenador
 Comissão de Ética para Análise de
 Projetos de Pesquisa - CAPPesq


 Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Dr. Orlando Piazza de Campos, 205, 8º andar - CEP 05403-010 - São Paulo - SP Fone: (011) 3069-3442 Fax: (011) 3069-6452 e-mail: capping@hcfmusp.br

ANEXO D - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Caracterização das lesões de estomatites relacionadas ao uso de inibidores de mTOR em pacientes transplantados renais

Pesquisador: Paulo Henrique Braz da Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 90602418.4.0000.0068

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.824.980

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma emenda ao estudo referente a alteração no TCLE, onde foi incluído a coleta de uma amostra de sangue. Assim serão colhidos amostras de sangue e de saliva de todos os participantes da pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

Emenda referente a alteração no TCLE, onde foi incluído a coleta de uma amostra de sangue.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Mantidos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nenhum.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE foi escrito em linguagem clara e objetiva.

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

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: 2.824.980

Adequado para aprovação.

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_BASICAS_1179392_E1.pdf	13/08/2018 07:48:04		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoimtorrevPB.pdf	13/08/2018 07:46:55	Fabiana Martins e Martins de Oliveira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	hc.pdf	13/08/2018 07:44:55	Fabiana Martins e Martins de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLImtortxrenalrev.pdf	13/08/2018 07:44:32	Fabiana Martins e Martins de Oliveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	cartaOdonto.pdf	28/05/2018 14:16:45	Fabiana Martins e Martins de Oliveira	Aceito
Folha de Rosto	FRMTOR.PDF	28/05/2018 14:15:39	Fabiana Martins e Martins de Oliveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuencia_estudo_Odonto.pdf	26/03/2018 11:37:12	Fabiana Martins e Martins de Oliveira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 16 de Agosto de 2018

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