

GABRIELLA BUENO MARINHO

Avaliação de herpesvírus em sangue e saliva de pacientes cirróticos

São Paulo

2022

GABRIELLA BUENO MARINHO

Avaliação de herpesvírus em sangue e saliva de pacientes cirróticos

Versão Corrigida

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

Área de concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais

Orientador: Profa. Dra. Karem López Ortega

São Paulo

2022

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

Marinho, Gabriella Bueno.

Avaliação de herpesvírus em sangue e saliva de pacientes cirróticos / Gabriella Bueno Marinho; orientador Karem López Ortega. -- São Paulo, 2022.
78 p. : tab. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- 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 corrigida.

1. Cirrose hepática. 2. Disfunção imune associada à cirrose. 3. Imunossupressão. 4. Herpesvírus humanos. 5. EBV. 6. Saliva. I. Ortega, Karem López. II. Título.

Marinho GB. Avaliação de herpesvírus em sangue e saliva de pacientes cirróticos. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 15/12/22

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Jefferson da Rocha Tenório

Instituição: Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ Julgamento: Aprovado

Prof(a). Dr(a). Juliana Bertoldi Franco

Instituição: HCFM-USP Julgamento: Aprovado

Prof(a). Dr(a). Michelle Palmieri

Instituição: FO-USP Julgamento: Aprovado

Dedico esse trabalho aos meus pais, Telma e Armando, por todos os esforços realizados para proporcionar a mim e as minhas irmãs todos esses anos de estudos. Vocês são a fonte mais genuína de amor e doação que eu conheço. Toda dedicação em tornar meus dias e esforços mais leves me permitiram chegar até aqui e me inspiram em exemplo de força e empatia. Obrigada pelo apoio incondicional em minhas decisões. Eu amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter guiado meus caminhos e me permitir chegar até aqui feliz e realizada, nutrindo meu coração de força e coragem. À Nossa Senhora por toda proteção e amor nos momentos de aflição.

Às minhas irmãs, Giullia e Giovanna, que são o maior presente que a vida já me deu. Ter o apoio de vocês é fundamental em qualquer projeto. Vocês sempre dizem que se orgulham e se espelham em mim, mas é justamente o contrário. Irei sempre me esforçar para alcançar a dedicação e o empenho de vocês. Obrigada por dividirem comigo diariamente a jornada de atravessar São Paulo para chegar até a USP. Cada conversa, desabafo e ajuda foram importantes para mim.

Ao Júnior, meu grande parceiro, que torna a vida leve e tranquila. Obrigada por sua dedicação infinita a mim e as minhas necessidades, nada disso seria possível sem o seu apoio. Você me fez forte quando precisei, coloriu meus dias quando estavam difíceis e me motivou sempre a ser melhor do que era antes. Obrigada por acreditar tanto em mim e por diariamente se mostrar ao meu lado para absolutamente tudo. Obrigada por ser o melhor parceiro de aventuras que eu poderia ter. Sei que juntos ainda vamos colecionar muitos outros momentos memoráveis.

Aos meus avós, João, Emília, Marlene e José. Deus foi muito bom em me permitir tê-los ao meu lado todo esse tempo. Obrigada por serem minha grande fonte de inspiração e carinho. À minha querida tia Dalva, que desde que eu era um bebê cuida de nossa família com tanto amor. Seu cuidado foi fundamental para minha formação. À minha tia Dani, obrigada por ser a tia mais amável e inspiradora que eu poderia ter e me presentear com suas jóias: Yara, Laís e Helena. Com vocês a vida se torna infinitamente melhor e mais alegre.

Às minhas amigas Handy, Heloísa e Vitória que desde a graduação dividem comigo a rotina da carreira acadêmica. Com vocês todas as dificuldades foram barreiras superadas e a rotina foi muito mais agradável. Obrigada por todos abraços e desabafos e por mesmo em meio a uma pandemia nunca me permitirem sentir só. À todos os meus colegas de pós graduação que me ofereceram suporte e amizade durante essa jornada: Mari, Gustavo, Chris, Ana e tantos outros que cruzaram meu caminho.

À minha tão querida orientadora professora Karem, que desde a graduação me acolheu com tanto carinho e paciência em seus ensinamentos, se tornando minha “mãe acadêmica” e me fornecendo tantas oportunidades únicas. É um privilégio ser sua aluna durante todos esses anos e conviver com o ser humano ímpar que é em todas as situações.

Ao meu eterno “pai de IC” Jefferson, por ser um grande mentor na vida e na jornada acadêmica, além de um grande incentivador durante todos esses anos. Obrigada por me ensinar tanto, sempre com muito carinho e paciência. À Natalia, por junto ao Jefferson, ser referência de carreira desde o início da minha jornada no Cape e até hoje ser parte importante dos meus estudos.

Ao professor Paulo Braz, referência de docente e pesquisador, e aos seus alunos do IMT: Carol, Alexandre e Rodrigo. Agradeço pela doação e pela disponibilidade. Mesmo em meio a uma pandemia, vocês viabilizaram a execução desse trabalho e sempre forneceram ajuda quando a dentista que se aventurava no mundo da virologia necessitava.

À professora Marina, sempre tão acolhedora e querida em seus ensinamentos, grande exemplo de pessoa e profissional. Aos professores do departamento de Patologia que tanto colaboraram para minha formação. Às queridas professoras da especialização mensal do Cape, Karin, Juliana e Janaína e a todas as alunas que me acolheram e tanto compartilharam comigo. Às nossas grandes parceiras Gil, Sandra, Selminha, Jeanne e Andressa que possibilitam com um trabalho tão competente nossa atuação no Cape.

Aos pacientes que gentilmente confiaram em meu trabalho e me ensinaram tanto sobre ciência, doação, amor e respeito. Obrigada por toda a motivação e por diariamente me fazer sentir especial.

À minha tão amada FOU SP, onde passei tantas horas da minha vida. Desde o primeiro dia que estive lá me senti em casa. Obrigada por me acolher como filha e me fornecer todo o suporte necessário para o desenvolvimento pessoal e científico.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Para ser grande, sê inteiro:
Nada teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa.
Põe quanto és no mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda brilha,
porque alta vive.”

Fernando Pessoa

RESUMO

Marinho GB. Avaliação de herpesvírus em sangue e saliva de pacientes cirróticos [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2022. Versão Corrigida.

Pacientes cirróticos em fila de transplante hepático possuem inúmeros prejuízos em vias fisiológicas, como a evidente deficiência imune. O dano ao sistema reticuloendotelial, o comprometimento das vias e células de defesa tornam o paciente hepatopata mais propenso ao desenvolvimento de infecções que influem em sua qualidade de vida e podem piorar o seu prognóstico. Ainda neste grupo, a existência de compostos tóxicos não excretados pelo fígado cirrótico pode favorecer quadros inflamatórios e a latência viral. A família dos Herpesvírus humanos (HHV) possui o atributo de desenvolver latência vitalícia nos indivíduos infectados e seus episódios de reativação podem ser precipitados por quadros de imunossupressão. O uso da saliva para identificação de HHV é viável e pode demonstrar os 8 subtipos virais em diferentes níveis. O objetivo deste estudo foi identificar a presença de HHV-1, HHV-2, VZV, EBV, CMV, HHV-6A, HHV-6B, HHV-7 e HHV-8 em amostras de plasma sanguíneo e saliva de pacientes com cirrose hepática em fila de espera pelo transplante e verificar se a presença desses vírus tem relação com dados da cirrose, como doença descompensada, complicações e etiologia, além de dados advindos de exames sanguíneos, como a população de leucócitos circulantes. Foi desenvolvido um estudo transversal observacional com dados demográficos e médicos de prontuários e amostras de sangue e saliva de 72 indivíduos cirróticos provindas do Biobanco da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, onde permaneceram congeladas em ultrafreezer até o momento da técnica da detecção da cadeia de polimerase. Foram utilizados dois protocolos distintos, o primeiro denominado HSV-Pan, que amplifica o DNA de HHV-1, HHV-2, EBV, CMV e HHV-8, e o segundo denominado VZV-Pan responsável pela amplificação de VZV, HHV-6 tipo A e B e HHV-7. Para as amostras positivas realizou-se subsequente digestão enzimática para identificação do subtipo de HHV. A amostra foi composta majoritariamente por indivíduos do sexo masculino (n=51, 70%), com média de idade 54 anos (DP=10). A mediana do índice MELD foi 15 (DP=6) e 59% foram

classificados com cirrose descompensada. 47,2% (n=34) apresentavam leucopenia. Não foram identificados HHV em amostras sanguíneas. Em saliva, os principais HHV identificados foram HHV-7 (n=42, 62%) e EBV (n=30, 41%). Houve correlação estatística entre a presença de HSV-Pan e a identificação de alterações em série branca sanguínea ($p=0,019$), especificamente com a população total de leucócitos ($p=0,025$), mas não houve correlação com subpopulações como neutrófilos e linfócitos. Essa correlação aconteceu, provavelmente, às expensas do EBV presente na saliva, já que apenas 5 pacientes apresentaram positividade para outros vírus. De fato, a correlação entre o EBV com leucócitos totais e com linfócitos apresentou-se estatisticamente significativa ($p=0,038$ e $p=0,047$, respectivamente). Não houve correlação entre a presença viral e outras variáveis independentes, como complicações da cirrose ou doença descompensada. Conclui-se que, na população estudada, a identificação de EBV na saliva está vinculada ao estado de imunidade circulante do paciente cirrótico. É possível que a deficiência imune apresentada pelos pacientes com cirrose possa ter um papel no *shedding* do EBV em saliva.

Palavras-chave: Cirrose hepática. Disfunção imune associada à cirrose. Imunossupressão. Herpesvírus humanos. EBV. Saliva.

ABSTRACT

Marinho GB. Evaluation of herpesvirus in blood and saliva of cirrhotic patients [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2022. Versão Corrigida.

Cirrhotic patients on the waiting list for liver transplantation have numerous losses in physiological pathways, such as evident immune deficiency. Damage to the reticuloendothelial system, compromised pathways and defense cells make patients with liver disease more prone to the development of infections that influence their quality of life and may worsen their prognosis. Also in this group, the existence of toxic compounds not excreted by the cirrhotic liver may favor inflammatory conditions and viral latency. The human herpesvirus (HHV) family has the attribute of developing lifelong latency in infected individuals and its reactivation episodes can be precipitated by immunosuppression. The use of saliva for HHV identification is feasible and can demonstrate the 8 viral subtypes at different levels. The aim of this study was to identify the presence of HHV-1, HHV-2, VZV, EBV, CMV, HHV-6A, HHV-6B, HHV-7 and HHV-8 in blood plasma and saliva samples from patients with liver cirrhosis. on the waiting list for transplantation and verify if the presence of these viruses is related to cirrhosis data, such as decompensated disease, complications and etiology, in addition to data from blood tests, such as the circulating leukocyte population. An observational cross-sectional study was carried out with demographic and medical data from medical records and blood and saliva samples from 72 cirrhotic individuals from the Biobank of the Faculty of Dentistry of the University of São Paulo, where they remained frozen in an ultrafreezer until the chain detection technique was used. of polymerase. Two different protocols were used, the first called HSV-Pan, which amplifies the DNA of HHV-1, HHV-2, EBV, CMV and HHV-8, and the second called VZV-Pan, responsible for the amplification of VZV, HHV-6 type A and B and HHV-7. For positive samples, subsequent enzymatic digestion was performed to identify the HHV subtype. The sample consisted mostly of male individuals (n=51, 70%), with a mean age of 54 years (SD=10). The median MELD index was 15 (SD=6) and 59% were classified as having decompensated cirrhosis. 47.2% (n=34) had leukopenia. No HHV were identified in blood samples. In saliva, the main HHV identified were HHV-7 (n=42, 62%) and EBV (n=30, 41%). There was

a statistical correlation between the presence of HSV-Pan and the identification of changes in white blood series ($p=0.019$), specifically with the total leukocyte population ($p=0.025$), but there was no correlation with subpopulations such as neutrophils and lymphocytes. This correlation was probably at the expense of the EBV present in the saliva, since only 5 patients were positive for other viruses. In fact, the correlation between EBV with total leukocytes and with lymphocytes was statistically significant ($p=0.038$ and $p=0.047$, respectively). There was no correlation between viral presence and other independent variables, such as complications from cirrhosis or decompensated disease. It is concluded that, in the population studied, the identification of EBV in saliva is linked to the state of circulating immunity of the cirrhotic patient. It is possible that the immune deficiency presented by patients with cirrhosis may play a role in shedding EBV in saliva.

Keywords: Liver cirrhosis. Immune dysfunction associated with cirrhosis. Immunosuppression. Human herpesviruses. EBV Spittle.

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.7	Sequência dos oligonucleotídeos para amplificação de região dentro do gene da DNA polimerase da família <i>Herpesviridae</i>	42
Tabela 5.1	Complicações da cirrose identificadas nos pacientes (n=72).....	44
Tabela 5.2	Comorbidades presentes nos pacientes com cirrose (n=72).....	45
Tabela 5.3	Medicações utilizadas pelos pacientes cirróticos (n=72).....	46
Tabela 5.4	Alterações no hemograma e na coagulação dos pacientes cirróticos (n=72).....	47
Tabela 5.5	Aspectos bucais da amostra (n = 72).....	47
Tabela 5.7	Associação entre HSV-PAN e VZV-PAN em saliva e cirrose descompensada.....	49
Tabela 5.8	Associação entre HSV-PAN em saliva e alterações sanguíneas.....	50
Tabela 5.9	Comparação entre contagem do HSV-PAN e VZV-PAN saliva e contagem de células brancas.....	53

Tabela 5.10	Associação entre EBV em saliva e variáveis independentes (n=30).....	56
Tabela 5.11	Associação entre HHV-7 em saliva e variáveis independentes (n=42).....	57
Tabela 5.12	Comparação entre contagem do EBV e HHV-7 em saliva e células brancas sanguíneas.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
APCs	Células apresentadoras de antígeno
CAAE	Certificado de apresentação de apreciação ética
CAID	Disfunção imune associada a cirrose
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CH	Cirrose Hepática
CMV	Citomegalovírus
DP	Desvio padrão
EBV	Vírus Epstein-Barr
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
HCMFUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HHV-1	Herpesvírus humano tipo 1
HHV-2	Herpesvírus humano tipo 2
HHV-3	Herpesvírus humano tipo 3
HHV-4	Herpesvírus humano tipo 4
HHV-5	Herpesvírus humano tipo 5
HHV-6	Herpesvírus humano tipo 6
HHV-7	Herpesvírus humano tipo 7
HHV-8	Herpesvírus humano tipo 8
HSV	Herpesvírus simples
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification
MELD	Model for End-stage Liver Disease
p*	p valor
PCR	Reação em cadeia da polimerase
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
VZV	Vírus varicela-zóster

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
μl	Microlitro
ml	mililitro
°C	Graus Celsius
nM	Nanômetro
<	menor que
>	maior que

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
3	PROPOSIÇÃO	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
5	RESULTADOS	43
6	DISCUSSÃO	61
7	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS	69
	ANEXOS	77

1 INTRODUÇÃO

A cirrose hepática é um quadro terminal resultante de injúrias ao fígado que ocorrem de forma contínua, e causam uma substituição do parênquima hepático por nódulos regenerativos envoltos por septos fibróticos. Neste quadro irreversível, estão comprometidas funções como produção e excreção da bile, controle endócrino e produção hormonal, metabolismo de macronutrientes, síntese de fatores de coagulação e suporte ao sistema imunológico (Pinzani et al., 2011; Trefts et al., 2017).

A atuação do fígado no sistema imune se dá em decorrência de possuir a maior coleção de células fagocíticas do corpo, as células de Kupffer, que revestem os sinusoides, participando assim do sistema reticulo endotelial (Kubes; Jenne, 2018). Na insuficiência hepática a metabolização de patógenos, citocinas e endotoxinas se encontra diminuída devido a menor ativação de monócitos e mobilização de neutrófilos. Somado ao quadro de comprometimento do sistema reticulo endotelial, o indivíduo cirrótico também apresenta outras alterações quantitativas e qualitativas em células brancas sanguíneas. Conseqüentemente, o indivíduo acometido pela cirrose apresenta maior susceptibilidade a infecções (Jeker, 2013; Albillos et al., 2014).

Diante das mais diversas disfunções ocasionadas pela cirrose que afetam a função imune, o desequilíbrio de células T circulantes é descrito como o fator que favorece reativação de infecções latentes, levando ao surgimento de doenças em decorrência da replicação viral (Lombardo et al., 1995; Figueiredo et al., 2017). Por outro lado, a incapacidade do fígado cirrótico em excretar compostos nitrogenados ocasiona o acúmulo que gera vasodilatação, toxicidade endógena e pode agir tanto intensificando quadros inflamatórios como mantendo a latência viral (Uehara et al., 2015).

Os Herpesvírus humanos (HHV) são uma família de vírus que possui como uma das principais características a latência. Os episódios de reativação desses vírus estão intimamente ligados a eficiência do sistema imunológico do indivíduo (Kennedy, 2021). O principal veículo de transmissão do HHV é a saliva, onde os 8 subtipos podem ser eliminados simultaneamente em diferentes níveis (Correa Sierra et al., 2017).

Pacientes imunossuprimidos excretam mais HHV em saliva que indivíduos saudáveis (Sarmiento et al., 2018). A análise do viroma salivar permite a detecção de diversos vírus, que provavelmente desempenham funções distintas na cavidade oral e podem influenciar a susceptibilidade a infecções virais humanas. As técnicas de isolamento de ácidos nucleicos virais provindos de fluidos orais, atrelada a tecnologia de sequenciamento e análise, fornecem ferramentas úteis para um screening de vírus conhecidos e desconhecidos (Corstjens et al., 2016). Dessa forma, o objetivo deste estudo é analisar a possível correlação entre o estado de imunossupressão ocasionado pela cirrose hepática, infecção por HHV e a detecção viral através da saliva.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CIRROSE HEPÁTICA

Doenças hepáticas crônicas representam um preocupante problema de saúde pública e causa de mortalidade. Dentre as principais etiologias estão: a infecção por vírus hepatotrópicos (vírus da hepatite B, C e D), a cirrose alcoólica, a doença hepática gordurosa não alcoólica e as causas autoimunes (Marcellin; Kutala, 2018; El-Serag, 2011).

Independente da etiologia, as doenças hepáticas crônicas progridem causando lesão do parênquima hepático com fibrogênese e ativação persistente de resposta inflamatória. O fígado fibrótico possui componentes moleculares, celulares e teciduais dinâmicos altamente integrados que desenvolvem cicatrizes através do acúmulo excessivo de componentes da matriz extracelular, na tentativa de limitar as consequências da lesão hepática crônica (Parola; Pinzani, 2019).

A cirrose é um quadro irreversível, no qual a estrutura do fígado se encontra alterada com a presença de nódulos regenerativos do parênquima circundados por septos fibróticos. Também podem ser vistas alterações na vascularização do órgão, que favorecem o surgimento da hipertensão portal, principal causa de outras complicações da cirrose, como a circulação colateral (Rosselli et al., 2013).

Na tentativa de contornar o aumento da pressão na veia porta, formam-se numerosas varizes e colaterais esplâncnicas por meio da reabertura e dilatação de canais vasculares extra-hepáticos originados de veias embrionárias colapsadas ou da neoformação de vasos associada a fatores angiogênicos aumentados, como fator de crescimento endotelial vascular. Esses vasos podem estar presentes virtualmente em todo o corpo e, por isso, são chamados de veias ou colaterais portossistêmicas. As paredes frágeis e finas desses vasos podem ser facilmente rompidas e levar a episódios de hemorragia digestiva alta. Esses episódios hemorrágicos além de representarem morbidade pela potencial alteração da volemia, podem precipitar quadros de encefalopatia hepática já que o sangue ao ser digerido libera amônia, resíduo originário do metabolismo das proteínas e que é transformado pelo fígado em ureia. A hiperamonemia é o principal responsável pela encefalopatia hepática (Shenoda; Boselli, 2019).

A deterioração da função hepática está intimamente relacionada ao aumento da concentração de compostos nitrogenados como amônia e óxido nítrico. A amônia se acumula no organismo em decorrência do aumento da produção no intestino e da dificuldade do fígado em transforma-la em ureia, para que seja excretada pelos rins (Ginès et al., 2021). Já o aumento da concentração de óxido nítrico está vinculado ao aumento da vascularização e circulação esplâncnica e ao aumento da produção desse agente vasoativo pelas células endoteliais, inicialmente como resposta ao estresse de cisalhamento vascular e, mais tarde, pela resposta inflamatória sustentada (Iwakiri; Trebicka, 2021). O óxido nítrico é relatado como um agente dúbio no organismo, que além de agir como vasodilatador e mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas, também pode favorecer infecções persistentes e latências virais através de efeito inibitório sobre células fagocitárias. Embora desempenhe um papel protetor em muitas infecções virais, o NO pode ser deletério em outras infecções, gerando inflamação e piorando as condições do paciente. As grandes concentrações de NO e Ca^{2+} em conjunto com o aumento de espécies reativas de oxigênio dentro das mitocôndrias, ativam as vias apoptóticas, que poderiam cooperar com a disseminação viral no tecido (Uehara et al., 2015).

Paralelamente ao acúmulo de compostos nitrogenados a insuficiência hepática pode levar a diversas anormalidades nos componentes do sistema imune adaptativo e inato, constituindo um quadro conhecido como disfunção imune associada à cirrose (CAID) (Albillos et al., 2014).

O fígado faz parte do sistema retículo endotelial por conter uma grande quantidade de macrófagos residentes que se dispõem no lúmen dos sinusoides hepáticos, aderidos às células endoteliais sinusoidais, e que são chamados de células de Kupffer (Nguyen-Lefebvre; Horuzsko, 2015). As células de Kupffer tem a capacidade de detectar, ligar e internalizar neutrófilos e patógenos apoptóticos e são consideradas células apresentadoras de antígenos (APCs). Compõe o quadro de imunovigilância local do fígado células T, células B, células natural killer (NK) e monócitos, além de outros APCs (células dendríticas e células endoteliais sinusoidais do fígado). Essas populações controlam a resposta inflamatória local, evitando assim a disseminação de sinais inflamatórios para além do fígado e, conseqüentemente, a inflamação sistêmica. As células parenquimatosas, como os hepatócitos, também possuem funções de vigilância, atuando como APCs e

produzindo componentes imunológicos críticos que estão envolvidos nas respostas imunes adaptativas e inatas (Albillos et al., 2022).

Mas, além do comprometimento do sistema reticuloendotelial, a substituição do parênquima hepático por fibrose igualmente leva à diminuição da produção de proteínas envolvidas nas respostas imunes inata e adaptativa (como proteína C reativa, proteína de ligação a lipopolissacarídeo, proteína de reconhecimento de peptidoglicano, CD14 solúvel) (Krenkel; Tacke, 2017).

Em um paciente cirrótico, a ausência dessas funções de maneira adequada compromete a resposta imunológica frente à estímulos, e torna o paciente mais suscetível a infecções (Albillos et al., 2014).

A hipertensão portal também tem sido responsabilizada pelo comprometimento do baço, além de outros fatores. Como o sangue da veia porta é proveniente do intestino, pâncreas e do baço, há um aumento da resistência na veia esplênica levando à diminuição de fluxo e causando esplenomegalia. Posteriormente o baço entra em colapso e inicia o sequestro hiperesplênico de componentes figurados do sangue (hiperesplenismo) (Weinzirl et al., 2020). Assim, adicionalmente, o quadro de hiperesplenismo associado à cirrose, é capaz de reduzir neutrófilos e linfócitos circulantes, gerando nesse indivíduo um quadro de imunossupressão (Jeker, 2013).

Além de modificar a função da vigilância imune local e de diminuir a quantidade de células brancas circulantes a cirrose compromete a função de neutrófilos, monócitos, linfócitos T, B e NK e afeta profundamente o tecido linfoide associado ao intestino (Albillos et al., 2014).

2.2 INFECÇÕES VIRAIS POR HERPESVÍRUS HUMANO

Os herpesvírus humano, pertencentes à família Herpesviridae, são vírus de DNA com fita dupla e simetria icosaédrica. São classificados de acordo com características biológicas e de genoma em: Alphaherpesvirinae (vírus herpes simplex [HSV] tipo 1 e 2 e vírus varicela-zoster [VZV]), Betaherpesvirinae (citomegalovírus [CMV], herpesvírus humano HHV-6 e HHV-7), e

Gammaherpesvirinae (vírus Epstein-Barr e herpesvírus tipo 8, associado ao sarcoma de Kaposi), (Ho et al., 2020).

O vírus herpes simplex HHV-1 infecta a maioria das pessoas no início da vida. A transmissão se dá principalmente em mucosas após exposição a secreções infectadas, e causa doenças como lesões labiais e estomatites (Miller; Danaher, 2008). Já o herpes simplex HHV-2 é transmitido principalmente pela via sexual, quando um indivíduo suscetível tem contato direto com outro que esteja excretando o vírus em superfícies mucosas ou lesões genitais, e causa a doença denominada herpes genital. Outras manifestações podem ocorrer decorrentes da infecção por HHV-1 e HHV-2, como o envolvimento ocular denominado ceratoconjuntivite, e uma complicação neurológica denominada encefalite, com altas taxas de mortalidade (Rechenchoski et al., 2017). Mais de 70% da população adulta tem anticorpos neutralizantes para herpes simplex, ou seja, já foram infectados por esses vírus. Apesar de vários fatores imunológicos do hospedeiro, o HHV persiste por toda a vida. O sucesso de sua perpetuação está relacionado a capacidade de episódios de reativação a partir da latência, que resultam no desenvolvimento de infecções recorrentes e formação de lesões por herpes simples (Miller; Danaher, 2008).

A taxa de excreção de HHV-1 e 2 em cavidade oral é altamente variável. A imunossupressão está relacionada tanto ao aumento de frequência, quanto de duração da excreção. Estudos demonstram que pelo menos 70% da população elimina o HHV-1 de forma assintomática pelo menos uma vez por mês, com carga viral suficiente para ocorrer transmissão (Miller; Danaher, 2008).

O herpesvirus humano tipo 3 (HHV-3) ou vírus da varicela-zóster (VZV) é o agente etiológico da varicela (na primo-infecção) e do herpes zoster (na sua reativação). Após a inoculação, o vírus se replica no tecido linfóide regional e é transportado para a pele através de uma viremia associada à célula, onde desenvolve erupção vesicular característica. Finalizada a infecção ativa, o vírus se torna latente em gânglios nervosos. A reativação do VZV é relacionada a fatores desencadeantes, como a imunossupressão, que reativam vírions ao longo de éxons neuronais e alcançam a pele (Ho et al., 2020). A excreção do VZV em saliva é descrita pela literatura como um evento de baixa prevalência, ainda que em indivíduos imunocomprometidos, como os infectados pelo HIV. Este fato demonstra um diferente padrão de excreção viral, pois a reativação que ocasiona doença por VZV acontece com baixa recorrência, majoritariamente de forma única e pontual

durante a vida. Além disso, o VZV pode estabelecer latência em gânglios distantes da cavidade oral, e ser indetectável em saliva (van Velzen et al., 2013).

HHV tipo 4, também denominado Epstein-Barr vírus (EBV) é um vírus ubíquo, presente em cerca de 95% da população mundial e que persiste por toda a vida do indivíduo após a fase aguda da infecção. A transmissão se dá principalmente pela saliva e quando acontece na infância geralmente é assintomática. Na adolescência é mais que comum que as pessoas infectadas apresentem um quadro clínico conhecido como mononucleose infecciosa (Kerr, 2019). A transmissão viral infecta células epiteliais da orofaringe, e, a partir destas, alcança seu principal reservatório, as células B, e nestas pode alternar entre ciclo de vida latente e lítico. Em indivíduos imunossuprimidos, a reativação viral pode favorecer uma proliferação descontrolada de linfócitos B infectados pelo EBV, e podem eventualmente favorecer o desenvolvimento de doenças linfoproliferativas. Outras patologias como linfoma de Burkitt, carcinoma nasofaríngeo e alguns tipos de linfomas são relatados pela literatura associados ao EBV (Kerr, 2019). Isso pode ser atribuído a capacidade de escape do EBV dos mecanismos antivirais celulares e das vias apoptóticas, além de seu mecanismo de evasão imune, principalmente tratando-se de indivíduos imunocomprometidos, onde o controle imunológico viral é ineficiente (Houen; Trier, 2021).

Recentemente, o Epstein-barr vírus (EBV) foi detectado em vasos sanguíneos relacionados à aneurismas de artéria coronária. Tal associação demonstra a influência das infecções virais na formação de alterações circulatórias, como varizes e aneurismas, cuja ruptura ocasiona hemorragias que podem levar à morte (Xiao et al., 2020). Em pacientes cirróticos, a existência da circulação colateral pode precipitar hemorragias digestivas severas que aumentam o risco de óbito (Foad et al., 2019). Ainda não há na literatura estudos que relacionem a infecção por EBV e hemorragias por rompimentos de varizes em pacientes cirróticos.

A eliminação viral de EBV em saliva de portadores saudáveis acontece de maneira extensa e contínua, de forma que sua carga viral é totalmente substituída em um período de 2 minutos. Essa alta dinâmica de eliminação sugere a participação de células epiteliais na amplificação da carga viral excretada. Assim, a boca não funciona como um reservatório viral, mas um conduto que mantém um fluxo de EBV contínuo presente em saliva. Estudos demonstram que a taxa de excreção de EBV em saliva varia pouco em horas e dias e entre indivíduos, mas

pode haver maiores variações em períodos mais longos, como meses e anos. Ainda que a carga viral excretada em saliva seja alta, a quantidade de EBV considerado infeccioso em indivíduos saudáveis é baixa (Hadinoto et al., 2009). Já em pacientes com algum grau de comprometimento sistêmico, a presença de DNA de EBV em saliva já foi relatada como um preditor significativo de lesões ulceradas de mucosa queratinizada (van der Beek et al., 2012).

HHV tipo 5 ou Citomegalovírus (CMV) é transmitido por contato com secreções contaminadas, como saliva, sangue, urina, sêmen e secreção cervical, por isso pode contaminar recém-nascidos durante o parto e indivíduos receptores de sangue e de órgãos transplantados. Em indivíduos saudáveis, a infecção primária quase sempre é assintomática ou se desenvolve como mononucleose congênita, já em indivíduos recém-nascidos ou imunocomprometidos existe o risco de infecções graves, encefalite, pneumonias, gastroenterites. Apesar das imunidades celular e adaptativa fornecerem uma resposta eficaz ao CMV, os indivíduos infectados desenvolvem latência vitalícia em células mieloprogenitoras e células de origem endotelial e epitelial (Ho et al., 2020). CMV pode ser excretado em saliva, porém com uma prevalência considerada baixa (Yamamoto et al., 2014). Um estudo demonstrou que de 109 indivíduos em idade infantil analisados, apenas 12 foram positivos para CMV em saliva, enquanto de 85 adultos, apenas 1 excretou CMV em saliva. Dos adultos participantes, 45% possuíam anticorpos para CMV em sangue, mas nenhum com indicativo de infecção aguda (Geris et al., 2022). Em indivíduos imunossuprimidos, o CMV pode ser encontrado em saliva com maior frequência, mas sua excreção ocorre de forma independente da reativação viral relacionada à infecção de células mononucleares do sangue periférico (Costa et al., 2021).

Os herpesvírus humanos 6A, 6B e 7 podem ser classificados como Roseolovírus humanos, e como os outros HHV também induzem infecção latente ao longo da vida. Em muitos casos, as infecções primárias e reativações ocorrem de forma assintomática mas podem ter desfechos graves em pacientes imunocomprometidos, como receptores de transplantes de órgãos sólidos e com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). HHV-6 é fortemente associado a quadros oportunistas, e causa manifestações como o exantema súbito, associada à infecção primária, e encefalite grave associada a reativações virais em receptores de transplantes de células tronco. É classificado em dois grupos não sobrepostos de espécies distintas, nomeados de HHV-6A e HHV-6B. São vírus que realizam

replicação preferencialmente em linfócitos T. Recentes descobertas relatam que proteínas virais codificadas por HHV-6 e HHV-7 tem funções imunomoduladoras, que ocasionam evasão da resposta imune específica e favorecem a persistência viral. Além disso, a persistência dos roseolovírus também é capaz de aumentar efeitos patológicos de outras infecções virais, como a ativação de CMV e EBV (Agut et al., 2016). As glândulas salivares foram identificadas como um importante sítio tanto de infecção ativa quanto de potencial de latência dos roseolovírus (Raposo et al., 2020). Estudos sugerem que os vírus HHV-6 e HHV-7 persistem no hospedeiro e são eliminados na saliva ao longo da vida, seja de indivíduos saudáveis ou imunocomprometidos. A taxa de excreção oral de HHV-6 em população saudável é considerada baixa, em torno de 10%, enquanto a excreção oral de HHV-7 pode variar de 12,6 a 90%, a depender da população analisada (Palmieri et al., 2018). A literatura ainda demonstra que a excreção oral de HHV-6 e HHV-7 pode estar relacionada a desfechos clínicos e prognósticos não favoráveis em pacientes transplantados de células tronco hematopoiéticas (Miranda-Silva et al., 2021).

O herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8) é associado a patologias que afetam indivíduos com AIDS: Sarcoma de Kaposi, um tipo raro de linfoma não-Hodgkin que se desenvolve em cavidades serosas e um tipo de doença linfoproliferativa rara chamada doença de Castleman multicêntrica. A transmissão se dá principalmente pelas vias sexuais, sanguíneas, vertical, salivares e em indivíduos receptores de transplantes. Assim como EBV, o HHV-8 é um vírus linfotrópico B, e por isso em patologias linfóides pode desempenhar papel transformador em proteínas virais oncogênicas ou reação imunitária excessiva que resulta nas manifestações clínicas já descritas. A imunossupressão do hospedeiro também age como cofator da infecção, num ambiente favorável a citocinas, facilitando o surgimento de doenças (Boulanger, 1999).

HHV-8 é um vírus menos prevalente na população. Sua frequência em fluidos corporais, como sangue, soro e saliva é muito baixa. Miranda-Silva et al. (2021) demonstra que a incidência de HHV-8 em saliva de pacientes transplantados de células hematopoiéticas é de 0% a 5%, dado que confirma a eficácia da terapia antiviral em grupos de pacientes imunossuprimidos que apresentam risco de desenvolvimento de lesões malignas por HHV-8. Ainda assim, a saliva fornece a possibilidade de rastreio do HHV-8 que pode estar presente de forma latente (Newton et al., 2018).

2.3 DETECÇÃO VIRAL ATRAVÉS DA SALIVA

A saliva está envolvida em diversas funções como efeitos antibacterianos, digestão e proteção dos tecidos orais, além de poder conter marcadores biológicos que podem apontar tanto alterações locais quanto sistêmicas (Zhang et al., 2016). É uma solução hipotônica dos ácinos salivares, exsudatos da mucosa e fluido gengival, contendo 99% de água e 1% de moléculas orgânicas, como amilase salivar, mucopolissacarídeos, mucinas e lisozimas e alguns compostos inorgânicos como sódio, potássio, cálcio e cloro. A maior parte de seu volume diário é secretado pelas glândulas salivares maiores (parótidas, submandibulares e sublinguais) que são circundadas por abundantes capilares, possibilitando trocas moleculares. Dessa forma, biomarcadores sanguíneos podem eventualmente estar presentes na composição da saliva e permitir a exploração e detecção precoce de doenças bucais e sistêmicas (Zhang et al., 2016).

Através da análise salivar é possível identificar diversas disfunções sistêmicas. Em pacientes com diabetes, por exemplo, identificam-se níveis salivares alterados de glicose, carboidratos, lipídeos e estresse oxidativo, existindo também a possibilidade de monitorar a glicose sanguínea através desse fluido (Satish et al., 2014). Citocinas inflamatórias salivares, como prostaglandina E₂, IL-1 β , IL-6 e TNF- α encontram-se aumentadas em quadros de inflamação, como a periodontite e a aterosclerose (Kosaka et al., 2014). Muitas outras moléculas expressas em saliva já foram relacionadas a incidência de neoplasias, inclusive em casos de lesões precursoras. Dessa forma, entende-se que a saliva funciona como um importante meio de identificação de disfunções sistêmicas e pode ser utilizada como ferramenta de rastreio em diversas situações (Wang et al., 2015).

A saliva também pode ser utilizada no diagnóstico e identificação de patógenos. As metodologias utilizadas com essa finalidade baseiam-se, cada vez mais, em tecnologias de amplificação de ácido nucleico, técnicas que são aplicáveis a qualquer matriz biológica, incluindo amostras orais. O diagnóstico baseado em ácido nucleico é atraente porque permite a detecção simultânea de múltiplos alvos (ou seja, multiplexação) (Corstjens et al., 2012).

Há décadas os testes de PCR foram considerados padrão ouro na identificação de HHV em tecidos corpóreos, fluidos como sangue e saliva, e lesões como vesículas e úlceras. Como a infecção por diversos subtipos de HHV pode

causar sintomatologia semelhante e demandar diversas reações de PCR e métodos de confirmação, Johnson et al. (2000) propuseram uma técnica de PCR abrangente, utilizando 2 pares de primers e análise por duas enzimas de restrição que possibilitam a detecção dos 8 subtipos de HHV, incluindo as variantes A e B do HHV-6.

Atualmente, utiliza-se o protocolo de Johnson et al. (2000) modificado, que consiste em duas reações, sendo uma específica para Herpes simplex 1 e 2, Herpesvírus 4 (EBV), Herpesvírus 5 (CMV) e Herpesvírus 8, denominada HSV-Pan. E a segunda para os Herpesvírus 3 (Varicella-zoster ou VZV), Herpesvírus 6 A e B e Herpesvírus 7, denominado VZV-Pan. Os pares de primers de ambas as reações tem como alvo uma região conservada do gene da DNA polimerase. As duas misturas de reagentes necessárias para a realização da PCR contêm concentrações distintas de primers, água e DNA extraído, além de produtos específicos para a reação de PCR, como Buffer Gold Star 10x (Promega, Madison, EUA) e Taq polimerase platinum (Invitrogen, Califórnia, EUA). A visualização do possível produto amplificado é realizada em corrida por eletroforese em gel de agarose 1,5%. Para as amostras positivas nas reações descritas acima, realiza-se uma etapa de digestão do produto por duas enzimas de restrição que permitem a diferenciação dos HHV. Uma mistura contendo o produto amplificado, enzimas, água e tampão específico passa por incubação e a visualização de padrão específico do tamanho de cada produto é feita novamente em corrida de eletroforese em gel de agarose 1,5%.

Dessa forma, é possível otimizar o tempo de trabalho laboratorial e os custos das reações que envolvem a identificação de todos os subtipos de HHV. O estudo também sugere a sensibilidade do PCR para a presença dos vírus linfotrópicos (EBV, HHV-6, HHV-7 e HHV-8), que podem ser identificados apenas pelo fato de permanecerem latentes em linfócitos presentes nesses tecidos ou fluidos sem replicação ativa, assim como também podem ser identificados em casos de doença (Johnson et al., 2000).

Amostras salivares são uma maneira mais simplificada de coleta, com risco de infecção viral entre indivíduo testado e coletor minimizado. Assim, a saliva pode ser considerada uma grande ferramenta identificadora de biomarcadores de doenças. No entanto, os estudos que apontam a substituição de exames já consolidados, como sangue e urina pela saliva ainda são recentes e necessitam de uma metodologia de avaliação salivar padronizada, assim como sistemas de identificação molecular salivar universais (Zhang et al., 2016).

3 PROPOSIÇÃO

OBJETIVO PRINCIPAL

Identificar a presença de HHV (HHV-1, HHV-2, VZV, EBV, CMV, HHV-6A, HHV-6B, HHV-7, HHV-8) em amostras de saliva e sangue de pacientes cirróticos em fila de transplante.

OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Identificar se a presença desses vírus está relacionada com a população de leucócitos circulantes, etiologia e complicações da cirrose e cirrose descompensada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Considerações Éticas

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), CAAE 29423520.8.0000.0075 e número do parecer 3.895.087.

4.2 Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo observacional de corte transversal executado com uma amostra de conveniência.

4.3 Casuística e critério de inclusão

Foram incluídos neste estudo, dados de prontuários, sangue e saliva de 72 pacientes cirróticos em fila de transplante hepático do Hospital da Clinicas da Faculdade de Medicina da USP (HCFMUSP). Os dados e as amostras faziam parte do Biobanco da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) e foram coletados em pesquisa executada anteriormente (CAAE 70741017.1.0000.0068; número do parecer 2.181.425). Todos os pacientes envolvidos na pesquisa anterior leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), no qual permitiram o armazenamento e uso das amostras e dados para pesquisas futuras.

4.4 Metodologia

4.5 Informações do prontuário

Foram acessadas informações referentes a dados demográficos (sexo e idade), data do diagnóstico da cirrose, MELD, comorbidades, complicações da cirrose, aspectos bucais, medicações em uso e resultados de hemograma e coagulograma.

Os pacientes também foram classificados, de acordo com o quadro clínico, em “compensados” e “descompensados”. Para fins dessa classificação utilizou-se a definição de Garcia-Tsao et al. (2010) que define a cirrose descompensada pelo desenvolvimento de complicações clinicamente evidentes de hipertensão portal (ascite, hemorragia varicosa, encefalopatia hepática) ou insuficiência hepática (icterícia). O estágio descompensado pode ainda ser subclassificado como mais severo, quando há o desenvolvimento de hemorragia recorrente de varizes, ascite refratária, hiponatremia e/ou síndrome hepatorenal.

4.6 Detecção molecular dos *herpesvírus humanos*

As amostras de sangue e saliva foram analisadas quanto a presença de HHV através do método de detecção molecular de 2 testes de PCR, realizados através da digestão acoplada a um painel de duas enzimas de restrição. Dessa forma, é possível amplificar e identificar os 8 subtipos de HHV com alto grau de sensibilidade e especificidade (Johnson et al., 2000).

O ácido nucleico (DNA / RNA) foi extraído a partir de 200 µl de cada amostra de plasma ou saliva com o uso da plataforma automatizada NucliSENS EasyMag (BioMérieux, Durham, NC), com uma eluição final de 100 µl, seguindo instruções do fabricante. A amostra contendo o material (DNA / RNA) extraído foi alíquotada em microtubos de 1,5 ml e armazenadas em ultra freezer a -80°C até processamento.

Para a detecção do DNA dos HHV foi utilizado um protocolo modificado de Johnson e cols. (2000). A reação é dividida em dois protocolos, sendo um visando a amplificação do DNA de herpes simplex 1 e 2, HHV-4 (EBV), HHV-5 (CMV) e HHV-8, denominada HSV-Pan. E o segundo para HHV-3 (Varicella-zoster ou VZV), HHV-6 A e B e HHV-7, denominado VZV-Pan. Os pares de primers de ambas as reações tem como alvo uma região conservada do gene da DNA polimerase, e estão descritos na tabela abaixo. As duas misturas de reagentes necessárias para a realização da PCR, contém uma concentração final de 1x do Buffer Gold Star 10x (Promega, Madison, EUA), 200 nM de cada primer (forward e reverso), 1 unidade de Taq polimerase platinum (Invitrogen, Califórnia, EUA), água ultrapura DEPC-tratada (Invitrogen, Califórnia, EUA) para ajuste final do volume de 50 µl, sendo 10 µl de amostra de DNA extraído. O protocolo de termociclagem para o HSV-Pan foi de 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 50 segundos, 62 °C por 50 segundos e 72°C por 1 minuto, com uma extensão final de 72°C por 10 minutos. O protocolo para VZV-Pan foi de 95° por 5 minutos, 45 ciclos de 95°C por 50 segundos, 50°C por 50 segundos e 72°C por 50 segundos, e uma extensão final de 5 minutos a 72°C. A visualização do possível produto amplificado foi feito em corrida por eletroforese em gel de agarose 1,5%.

Para as amostras positivas nas reações descritas acima, seguiu-se uma etapa de digestão do produto por duas enzimas de restrição, FastDigest Bam HI e FastDigest Bsh1236I (BstUI) (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies Brasil, Brasil) para diferenciação dos HHV. Uma mistura contendo 10 µl do produto amplificado, 1,5 µl de tampão específico (10x Fast Buffer), 1µl da enzima e 2,5 µl de água ultrapura livre de Dnase e RNase, para um volume final de 15 µl de reação é incubado por 30 minutos a 37°C. A visualização de padrão específico do tamanho de cada produto foi feita novamente em corrida de eletroforese em gel de agarose 1,5%.

Tabela 4.7: Sequência dos oligonucleotídeos para amplificação de região dentro do gene da DNA polimerase da família *Herpesviridae*. Primers forwards estão indicados como P1, enquanto os primers reversos estão indicados como P2.

Primers	Sequências (5' – 3')
HSV-Pan-P1	5'-GTGGTGGACTTTGCCAGCCTGTACCC-3'
HSV-Pan-P2	5'-TAAACATGGAGTCCGTGTGCGCCGTAGATGA-3'
VZV-Pan-P1	5'-GTCGTGTTTGATTTTCAAAGTTTATATCC-3'
VZV-Pan-P2	5'-ATAAACACACAATCCGTATCACCATAAATAACCT-3'

4.8 Análise Estatística

Os dados foram analisados no software Statistical Package for the Social Science (SPSS® for Windows, versão 22.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para testar a hipótese de normalidade das variáveis quantitativas, onde foi verificada distribuição não-paramétrica dos dados. Foi realizada análise descritiva dos dados através de frequências, média, desvio-padrão, mediana, valor mínimo e máximo. Na análise bivariada para variáveis quantitativas, foram utilizados o teste de Kruskal-Wallis e o teste de Mann Whitney para comparação entre a distribuição dos dados entre variáveis independentes e os valores mensurados em saliva e plasma. Na análise das variáveis qualitativas, foram aplicados teste qui-quadrado e razão de verossimilhança. Para verificar a correlação entre os valores em saliva e plasma foi aplicada correlação de Spearman. Foram considerados estatisticamente significativos valores $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Análise descritiva

A amostra era composta predominantemente por pacientes do sexo masculino (n=51; 70,8%), com média de idade de 54,8 anos (mediana = 57; DP=10,0). O valor médio do MELD era de 16,71 (mediana=15; DP=6,85). As principais etiologias da cirrose foram a infecção pelo vírus da hepatite C (n=22; 30,55%), a cirrose alcóolica (n=21; 29,16%) e a cirrose criptogênica (n=06; 8,33%). O tempo de acompanhamento hospitalar dos pacientes variou de 1 a 3 anos e a maioria apresentava cirrose hepática descompensada (59,7%).

Na tabela 5.1 podem ser vistas as complicações da cirrose que os pacientes apresentavam.

Tabela 5.1 - Complicações da cirrose identificadas nos pacientes (n=72)

Complicações da cirrose	n (%)
Circulação colateral	
Não	14 (19,4)
Sim	58 (80,6)
Ascite	
Não	29 (40,3)
Sim	43 (59,7)
Encefalopatia hepática	
Não	57 (79,2)
Sim	15 (20,8)
Hiperesplenismo	
Não	12 (16,7)
Sim	60 (83,3)
Peritonite Bacteriana Espontânea	
Não	70 (97,2)
Sim	02 (2,8)
Hemorragia Digestiva Alta	
Não	45 (62,5)
Sim	27 (37,5)

Fonte: O autor.

Dentre os 72 pacientes, 43 (59,7%) apresentavam cirrose descompensada, caracterizada clinicamente pela presença de ascite ou encefalopatia hepática ou hemorragia digestiva alta.

Além das complicações da cirrose, os pacientes também apresentavam uma série de comorbidades que poderiam caracterizar a severidade da descompensação (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 – Comorbidades presentes nos pacientes com cirrose (n=72)

COMORBIDADES	n (%)
Nefropatias	
Não	64 (88,9)
Sim	08 (11,1)
Diabetes Mellitus tipo 2	
Não	54 (75,0)
Sim	18 (25,0)
Doença arterial coronariana	
Não	64 (88,9)
Sim	08 (11,1)
Hipertensão arterial sistêmica	
Não	49 (68,1)
Sim	23 (31,9)
Anemia*	
Não	25 (35,7)
Sim	45 (64,3)

*Informação ausente em dois prontuários

Fonte: O autor.

Apesar da nefropatia estar presente em 8 pacientes, nenhum deles requeria a instituição de terapias renais substitutivas.

Em decorrência da presença de ascite, 19 pacientes já tinham sido submetidos à paracentese, alguns mais de duas vezes (n=8), mas a maioria controlava a condição através do uso de medicações. As medicações, utilizadas para o controle das complicações da cirrose e das comorbidades apresentadas pelos pacientes cirróticos, estão dispostas na tabela 5.3.

Tabela 5.3: Medicções utilizadas pelos pacientes cirróticos (n=72)

Medicções em uso	n (%)
Anti-hipertensivos	50 (69,4)
Diuréticos	58 (80,5)
Protetores gástricos	33 (45,8)
Lactulose	21 (29,1)
Hipoglicemiante oral / insulina	24 (33,3)
Vitaminas	18 (25,0)
Antibióticos	16 (22,2)
Analgésicos	11 (15,2)
Antidepressivos	10 (13,8)
Ferro	10 (13,8)
Hormônios	7 (9,7)
Ácido ursodesoxicólico	6 (8,3)

Fonte: O autor.

Além das comorbidades e das complicações da cirrose também foi possível verificar que a maioria dos pacientes apresentava alterações no hemograma e no coagulograma. As alterações na série branca (caracterizada pela diminuição na quantidade de leucócitos, neutrófilos ou linfócitos) e a presença de coagulopatia (caracterizada pela diminuição na quantidade de plaquetas e/ou aumento do INR) foram menos frequentes que as alterações na série vermelha (representada pela diminuição de hemoglobina, hemácias e hematócrito) (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 - Alterações no hemograma e na coagulação dos pacientes cirróticos (n=72)

Alterações de série vermelha	n(%)
Não	21 (29,1)
Sim	51 (70,8)
Alterações de série branca	n (%)
Não	38 (52,7)
Sim	34 (47,2)
Coagulopatia	n (%)
Não	46 (63,8)
Sim	26 (36,1)

Fonte: O autor.

As alterações sistêmicas que os pacientes apresentavam também se refletiam na região oral, sendo o hálito hepático, a xerostomia e a hipossalivação as mais importantes (Tabela 5.5).

Tabela 5.5 - Aspectos bucais da amostra (n = 72):

Variáveis	n (%)
Hálito hepático	
Não	51 (70,8)
Sim	21 (29,2)
Xerostomia*	
Não	40 (57,1)
Sim	30 (42,9)
Hipossalivação*	
Não	48 (68,6)
Sim	22 (31,4)

*Informação ausente em dois prontuários

Fonte: O autor.

5.6 Análise de correlação

As amostras de sangue e saliva dos 72 pacientes incluídos no estudo foram testadas para a presença de HHV. No plasma todas as amostras foram negativas, mas em saliva 35 (48,6%) foram positivas para HSV-Pan e 47 (65,2%) para VZV-Pan.

Na tabela 5.7 se encontram os resultados de associação entre a presença de HHV na saliva de pacientes cirróticos e a presença de descompensação (variável independente). Não foram encontradas associações estatisticamente significantes.

Na tabela 5.8 encontram-se os resultados de associação da presença de HHV nas amostras do estudo com resultados de exames sanguíneos dos pacientes incluídos na pesquisa. Pode-se observar que a relação entre alterações em série branca sanguínea e a presença de HHV em HSV-Pan é estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabela 5.7 – Associação entre HSV-Pan e VZV-Pan em saliva e cirrose descompensada:

Variáveis	HSV-Pan saliva		p*	VZV-Pan saliva		p*
	Ausente	Presente		Ausente	Presente	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)		
Cirrose descompensada						
Não	13 (35,1)	16 (45,7)	0,360*	10 (40,0)	19 (40,4)	0,972*
Sim	24 (64,9)	19 (54,3)		15 (60,0)	28 (59,6)	

* Teste Qui-Quadrado

Fonte: O autor.

Tabela 5.8 – Associação entre HSV-Pan e VZV-Pan em saliva e alterações sanguíneas:

Variáveis	HSV-PAN saliva		p*	VZV-PAN saliva		p*
	Ausente n (%)	Presente n (%)		Ausente n (%)	Presente n (%)	
Alteração em série branca						
Não	25 (67,6)	13 (37,1)	0,019	12 (48,0)	26 (55,3)	0,554
Sim	12 (32,4)	22 (62,9)		13 (52,0)	21 (44,7)	
Alteração em série vermelha						
Não	12 (32,4)	09 (25,7)	0,713	07 (28,0)	14 (29,8)	0,874
Sim	25 (67,6)	26 (74,3)		18 (72,0)	33 (70,2)	
Coagulopatia						
Não	24 (64,9)	22 (62,9)	0,859	15 (60,0)	31 (66,0)	0,808
Sim	13 (35,1)	13 (37,1)		10 (40,0)	16 (34,0)	

* Teste Qui-Quadrado.

Fonte: O autor.

A tabela 5.9 demonstra os resultados de testes comparativos entre a presença de HHV em HSV-Pan e VZV-Pan de saliva e contagem de células brancas disponíveis em hemograma dos pacientes do estudo. Essa associação foi realizada para entender se a presença de HHV estaria relacionada ao estado imunológico do paciente cirrótico, demonstrado através da contagem de células brancas sanguíneas. Neste teste, foi possível observar a relação entre a contagem de leucócitos dos indivíduos do estudo com a presença de HHV em HSV-Pan de saliva.

Tabela 5.9 – Comparação entre presença do HSV-Pan e VZV-Pan em saliva e contagem de células brancas:

Variáveis	HSV-Pan saliva		p*	VZV-Pan saliva		p*
	Ausente	Presente		Ausente	Presente	
Leucócitos (mil céls/ mm³)						
N	37	35	0,025	25	47	0,666
Mediana	4,51	3,30		3,50	3,72	
Intervalo interquartil	2,52	1,93		2,43	2,45	
Neutrófilos (mil céls/ mm³)						
N	37	35	0,065	25	47	0,372
Mediana	2,83	2,08		2,11	2,42	
Intervalo interquartil	1,94	1,23		1,62	1,82	
Linfócitos (mil céls/ mm³)						
N	37	35	0,060	25	47	0,670
Mediana	1,05	0,81		0,96	0,94	
Intervalo interquartil	0,86	0,64		0,88	0,90	

Valores de referência: leucócitos 3,9 a 10,2 X 10³ / µL; neutrófilos 1,5 a 7,7 X 10³ / µL; linfócitos 1,1 a 4,5 X 10³ / µL.

* Teste de Mann-Whitney.

Fonte: O autor.

Dentre as amostras positivas para o HSV-Pan, 30 (41,7%) foram positivas para o EBV, 4 (5,6%) para o HSV-1 e 1 (1,4%) para o CMV. No VZV-Pan 46 (63,8%) foram positivas para o HHV-7 e 1 (1,4%) positiva para HHV-6 + HHV-7.

Como o EBV e o HHV-7 estiveram presentes em uma quantidade maior de amostras de saliva, foram executadas avaliações específicas para verificar se esses dois subtipos de HHV poderiam estar relacionados com alguma das características dos pacientes cirróticos, como sexo e cirrose descompensada.

Outras características também foram utilizadas como variáveis independentes, como a presença de hemorragia digestiva alta e sintomas secos. Como a literatura já relacionou a presença de EBV com eventos adversos decorrentes de alterações circulatórias e síndrome de Sjogren, julgamos necessário realizar tais associações, que nessa amostra não foram estatisticamente significantes. A infecção por HHV pode alcançar o sistema nervoso central e ocasionar um quadro grave de inflamação denominado encefalite. Nessa amostra, muitos pacientes relataram como complicação da cirrose a encefalopatia hepática. Dessa forma, buscamos estudar se havia alguma associação entre essa complicação com a infecção por HHV-7 e EBV, os HHV mais prevalentes no grupo de estudo.

A tabela 5.10 demonstra resultados da associação entre a presença de EBV em saliva de pacientes cirróticos com variáveis independentes da amostra. Dentre os fatores estudados, não houve associação estatisticamente significativa.

Tabela 5.10 – Associação entre EBV em saliva e variáveis independentes (n=72)

Variáveis	EBV saliva		p*
	Ausente n (%)	Presente n (%)	
Sexo			
Feminino	11 (26,2)	10 (33,3)	0,693*
Masculino	31 (73,8)	20 (66,7)	
Hemorragia digestiva alta			
Não	27 (64,3)	18 (60,0)	0,902*
Sim	15 (35,7)	12 (40,0)	
Sinais e sintomas secos^a			
Não	19 (47,5)	19 (63,3)	0,283*
Sim	21 (52,5)	11 (36,7)	
Encefalopatia hepática			
Não	36 (85,7)	21 (70,0)	0,185*
Sim	06 (14,3)	09 (30,0)	
Cirrose descompensada			
Não	16 (38,1)	13 (43,3)	0,839*
Sim	26 (61,9)	17 (56,7)	

* Teste Qui-Quadrado.

^a presença de xerostomia ou hipossalivação. Informação ausente em 2 prontuários.

Fonte: O autor.

A tabela 5.11 demonstra a associação entre a presença de HHV-7 nas amostras de saliva e variáveis independentes dos pacientes incluídos no estudo.

Tabela 5.11 – Associação entre HHV-7 em saliva e variáveis independentes (n=72)

Variáveis	HHV-7 saliva		P
	Ausente n (%)	Presente n (%)	
Sexo			
Feminino	09 (34,6)	12 (26,1)	0,621*
Masculino	17 (65,4)	34 (73,9)	
Hemorragia digestiva alta			
Não	15 (57,7)	30 (65,2)	0,704*
Sim	11 (42,3)	16 (34,8)	
Sintomas secos^a			
Não	14 (56,0)	24 (53,3)	0,830*
Sim	11 (44,0)	21 (46,7)	
Encefalopatia			
Não	21 (80,8)	36 (78,3)	0,527**
Sim	05 (19,2)	10 (21,7)	
Cirrose descompensada			
Não	11 (42,3)	18 (39,1)	0,989*
Sim	15 (57,7)	28 (60,9)	

* Teste Qui-Quadrado; ** Teste Exato de Fischer.

^a Informação ausente em 2 prontuários.

Fonte: O autor.

A tabela 5.12 demonstra os resultados encontrados em testes comparativos entre a presença de EBV e HHV-7 com a contagem de células brancas sanguíneas. Como esses subtipos virais foram os mais prevalentes na amostra, buscamos entender se havia relação entre a presença viral com o quadro de imunossupressão demonstrado pelos dados de leucócitos, linfócitos e neutrófilos. Os resultados foram estatisticamente significativos para EBV nas variáveis de leucócitos e linfócitos.

Tabela 5.12 – Comparação entre presença do EBV e do HHV-7 em saliva e células brancas sanguíneas

Variáveis	EBV saliva		p*	HHV-7 saliva		p*
	Ausente	Presente		Ausente	Presente	
Leucócitos (mil céls/mm ³)						
N	42	30	0,038	26	46	0,963
Mediana	4,37	3,20		3,76	3,70	
Intervalo interquartil	2,28	2,06		2,70	2,29	
Neutrófilos (mil céls/mm ³)						
N	42	30	0,126	26	46	0,631
Mediana	2,70	2,06		2,25	2,37	
Intervalo interquartil	1,90	1,30		1,69	1,70	
Linfócitos (mil céls/mm ³)						
N	42	30	0,047	26	46	0,542
Mediana	1,01	0,79		0,96	0,91	
Intervalo interquartil	0,80	0,64		0,80	0,92	

Valores de referência: leucócitos 3,9 a 10,2 X 10³ / µL; neutrófilos 1,5 a 7,7 X 10³ / µL; linfócitos 1,1 a 4,5 X 10³ / µL.

* Teste de Mann-Whitney.

Fonte: O autor.

6 DISCUSSÃO

Os HHV possuem uma importante característica relacionada ao desenvolvimento de infecções latentes. Os principais estímulos envolvidos com a reativação dos HHV são alterações no estado de defesa imunitária do paciente e eventos estressantes (Crimi et al., 2019).

A disfunção imune associada a doença hepática tem sua gravidade paralela ao estágio da cirrose. Em quadros descompensados, a inflamação sistêmica e o excesso de respostas inflamatórias desregulam células efetoras imunes, e desenvolvem prejuízos em funções bactericidas e fagocíticas. Adicionalmente, o funcionamento exacerbado da via esplênica favorece o sequestro de células sanguíneas viáveis, e aumenta a susceptibilidade a infecções (Albillos et al., 2022). Até o momento, não há um biomarcador específico para mensurar o grau da disfunção imune presente na cirrose. Os pacientes são classificados de acordo com a presença de sinais clínicos e complicações da doença.

Disfunções imunes podem facilitar estados de replicação viral e, eventualmente, a instalação de doenças clínicas, que podem caracterizar-se pela simples presença de erupção vesicular (HSV-1, HSV-2 e VZV), causar doença visceral (CMV, HHV-6 e HHV-7) e, até mesmo, várias malignidades como linfoma de Hodgkin, linfoma de Burkitt, carcinoma gástrico, carcinoma nasofaríngeo (EBV) e linfoma de efusão primária, doença multicêntrica de Castleman, sarcoma de Kaposi (HHV-8) (Cohen, 2020).

O presente estudo buscou identificar a prevalência de herpesvirus em sangue e saliva de pacientes cirróticos e correlaciona-la com indicadores clínicos que indiquem alterações do sistema de imunovigilância.

Foram analisados 72 indivíduos cirróticos que aguardavam por transplante hepático. A maioria dos pacientes apresentava MELD entre 10 e 19, significando que possuíam 6% de chance de morrer nos próximos 3 meses (Jung et al., 2008) ou seja, naquele momento, apresentavam uma condição clínica que estava relacionada com menor taxa de mortalidade.

Por outro lado, a maioria dos pacientes apresentava alguma complicação grave da cirrose, o que caracterizava uma situação de aumento da morbidade.

A hipertensão portal encontrava-se presente em todos os pacientes. Sabe-se que essa complicação pode desencadear outras alterações importantes que influem diretamente no prognóstico do indivíduo, como a circulação colateral, presente em mais de 80% da amostra. Mais da metade desses pacientes foram classificados em fase descompensada da doença por apresentar ascite, encefalopatia hepática ou hemorragia digestiva alta, e quase a metade demonstrava alterações em série branca sanguínea. Tais indícios sugerem comprometimento na resposta imune desse grupo.

Outras alterações presentes, como nefropatias e diabetes mellitus tipo 2 também podem influenciar a resposta imune dos pacientes (Albillos et al., 2022; Elkrief et al., 2016) mas apenas uma pequena parcela da amostra apresentava essas condições.

Verificando as medicações utilizadas pelos participantes incluídos no estudo é possível identificar medicações cujo objetivo é controlar complicações importantes da cirrose e que estão associadas a quadros mais graves da condição, vinculados à descompensação.

O uso rotineiro de anti-hipertensivos e diuréticos por quase 70% e 80% dos pacientes, respectivamente, indica a intenção de manejar a hipertensão portal e suas consequências, como a ascite (Ginès et al., 2021).

A lactulose é utilizada com a finalidade de emulsificar o bolo fecal, combatendo a constipação intestinal e a geração de uma maior quantidade de amônia, apontada como principal responsável pela encefalopatia hepática (Mansour; McPherson, 2018).

Os antibióticos, como a neomicina, o metronidazol e a rifaximina, também tem função semelhante à da lactulose, já que objetivam combater a formação de amônia e, como consequência, a encefalopatia hepática (Ginès et al., 2012).

Mas como são utilizados para diminuir a flora bacteriana intestinal também podem atuar diminuindo as chances de translocação bacteriana e consequente infecção do líquido ascítico (peritonite bacteriana espontânea) (Ginès et al., 2012).

Os protetores gástricos, que são ministrados com o principal objetivo de evitar ruptura de varizes, apresentam também um efeito secundário sobre a geração de amônia, já que com a ruptura de varizes a digestão do sangue leva a produção desse composto (Olde Damink et al., 2002).

Dessa forma nota-se que, apesar de mais de 50% dos pacientes apresentarem cirrose descompensada esse número poderia ser maior, mas o controle medicamentoso contribui não só para a menor quantidade desses eventos como para diminuição da severidade dos mesmos (Ginès et al., 2021).

As complicações da cirrose estão estreitamente relacionadas com a descompensação e esta por sua vez com a instalação e severidade da CAID (Albillos et al., 2022). Outro fator que se relaciona com a CAID é a inflamação. Uma boa parte dos pacientes do estudo tinham como etiologia da cirrose a hepatite C, uma doença infecciosa viral que leva a um estado de hiporrestimulação imune, originando uma série de manifestações extrahepáticas (Weersink et al., 2020).

O terceiro fator que pode ser associado à CAID é a imunidade circulante dos pacientes, aferida, neste trabalho, através da quantidade de leucócitos totais e duas subpopulações. Apesar de mais de 50% dos pacientes deste estudo apresentarem diminuição dessas populações celulares, possivelmente em decorrência do sequestro hiperesplênico, sabe-se que a simples diminuição para níveis inferiores aos preconizados como valores de normalidade, não constitui, por si só, um estado de alteração da imunidade que tenha consequências clínicas (Irvine et al., 2019). Ainda assim, cabe lembrar que a funcionalidade desses linfócitos pode estar alterada no âmbito da cirrose hepática (Albillos et al., 2022).

De forma geral, os dados dos pacientes apontavam para a presença de uma disfunção imune, ainda que também evidenciassem que talvez esta disfunção não fosse severa. Assim, era de se esperar que fossem identificados vírus que tem essa capacidade de latência no organismo humano, como os HHV (Sarmiento et al., 2018).

Ao avaliar a presença de HHVs nas amostras desses pacientes, constatou-se que nenhuma amostra de plasma sanguíneo foi positiva para VZV-Pan ou HSV-Pan. Esse fato era esperado em decorrência de que o plasma sanguíneo representa uma fração acelular do sangue (Goodrum, 2022). A identificação de HHV, por PCR, no plasma demonstraria a presença de virions, indicando a ocorrência de ciclo lítico (Johnson et al., 2000).

Em saliva foi encontrada positividade para o VZV-Pan e para o HSV-Pan em 65,2% e 48,6%, respectivamente, das amostras analisadas. A positividade das amostras de saliva não está necessariamente vinculada à fase lítica ou a reativação viral. Essa positividade provavelmente está vinculada aos tipos celulares nos quais

muitos HHVs fazem latência, como as células epiteliais, e que estão presentes na composição da saliva (Miranda-Silva et al., 2020).

A positividade para o HSV-Pan foi mais prevalente em pacientes com alterações na série branca, especificamente em pacientes com diminuição na quantidade de leucócitos totais circulantes, mas não apresentou correlação com subpopulações como linfócitos e neutrófilos.

Após a digestão enzimática, foram identificados, quase que exclusivamente, o EBV (41,7%) e o HHV-7 (63,8%), fato pelo qual somente os dois fizeram parte das análises de correlação.

No HSV-Pan, além do EBV, em 4 amostras foi identificado o HSV-1, 1 amostra foi positiva para o CMV e 1 amostra para o HHV-6B (em conjunto com HHV-7). Como todos esses vírus podem ser esporadicamente encontrados em saliva (Costa et al., 2021), a pequena prevalência deles no grupo estudado e a ausência de manifestações clínicas compatíveis com infecção ativa, inviabiliza a atribuição de algum significado biológico.

Não foram identificados em nenhuma amostra o VZV e o HHV-8, fato que corrobora achados anteriores da literatura que apontam para a identificação desses vírus em saliva somente na doença ativa ou em estados de imunossupressão severa (Birlea et al., 2014; Wang et al., 2010).

A identificação de alta prevalência tanto do EBV como do HHV-7 em amostras de saliva, era um resultado esperado, já que esses vírus costumam estar presentes na saliva da maioria das pessoas e o shedding viral costuma ser estável em pequenos períodos de tempo, variando somente após longos períodos (Huynh; Rong, 2012).

Mas a presença do EBV na saliva dos pacientes estudados se correlacionou positivamente com a diminuição da quantidade de leucócitos totais e com a subpopulação de linfócitos. Como a resposta imune inata e adaptativa a vírus tem forte envolvimento de linfócitos (Mueller; Rouse, 2008), é possível inferir que a depleção dessa subpopulação possa facilitar a diminuição da imunovigilância ao EBV. Também é importante lembrar que além da alteração da quantidade, importantes modificações funcionais são encontradas nessas subpopulações

celulares no âmbito da cirrose, e, dessa forma, mesmo pequenas alterações quantitativas poderiam ter reflexos clínicos (Albillos et al., 2022).

O EBV apresenta duas fases a lítica e a latente. Na primeira existe a produção de partículas virais, na segunda o vírus mantém uma infecção persistente na forma de epissomos, ligando o genoma viral aos cromossomos dessas células, possibilitando a partição dos epissomos para as células filhas. Eventualmente, um reservatório de infecção latente persistente ao longo da vida é mantido em um pequeno número de células B de memória. Essas células B infectadas pelo EBV podem então se diferenciar em plasmócitos e reativar o perfil de expressão do gene lítico do EBV, o que lhes permite levar o EBV de volta à orofaringe para posterior transmissão através da saliva (Wong et al., 2022)

A presença do EBV na saliva indica que a reativação ocorre com muita frequência e que ele tem a capacidade de contornar, de alguma forma, o sistema imune do indivíduo. Mas é a integridade do sistema de imunovigilância que restringe essa replicação e previne a instalação de doença clínica (Cohen, 2020).

Por outro lado, a persistência da infecção pelo EBV tem sido associada a diversos tipos de neoplasias malignas como alguns tipos de linfomas, doença de Hodgkin e carcinoma de nasofaringe (Ayee et al., 2020). Pacientes com cirrose eventualmente irão requerer transplante de fígado. Após o transplante o uso da terapia imunossupressora aumenta a incidência de linfomas, que frequentemente se originam de células B, e de desordens linfoproliferativas. O EBV está associado com cerca de 70% desses casos em pacientes imunossuprimidos, já que o sistema imune não consegue mais controlar a proliferação das células B transformadas pelo EBV (Patel et al., 2021).

É importante lembrar que a alta prevalência do EBV além de ter o potencial de aumentar a morbidade dos pacientes, particularmente após o transplante, também identifica um grupo de pacientes que pode ser uma fonte de transmissão do EBV.

Desta forma pode ser importante implementar, futuramente, estudos longitudinais específicos que possam estudar melhor o papel do EBV em pacientes cirróticos que estejam em fila de transplante e após o transplante de fígado.

Um possível fator complicador para a identificação de vírus na saliva de pacientes com cirrose poderia ser o aumento de óxido nítrico, que pode atuar como um agente microbicida, combatendo alguns tipos de vírus (Garre et al., 2020). Mas parece que esse composto não teve a capacidade de inibir o EBV e o HHV-7 em pacientes com cirrose ou que a alteração imunológica desses pacientes foi mais expressiva e manteve a prevalência desses vírus na saliva.

Este trabalho possui limitações que devem ser apontadas: a amostra pode ser considerada pequena e heterogênea em relação as variáveis e o desenho transversal do estudo.

De qualquer forma os resultados parecem confirmar a importância do uso da saliva para identificação de alguns herpesvirus, como o EBV. Dessa forma, parece importante seguir com novos estudos para identificar o comportamento desses vírus e eventuais complicações clínicas causadas por eles em pacientes cirróticos e transplantados de fígado.

7 CONCLUSÃO

A identificação do EBV na saliva está vinculada ao estado de imunidade circulante do paciente cirrótico, na população estudada. É possível que a deficiência imune apresentada pelos pacientes com cirrose possa ter um papel no *shedding* do EBV em saliva, mas mais estudos tem que ser executados para confirmar estes achados.

REFERÊNCIAS¹

Agut H, Bonnafous P, Gautheret-Dejean A. Human Herpesviruses 6A, 6B, and 7. *Microbiol Spectr*. 2016 Jun;4(3). doi: 10.1128/microbiolspec.DMIH2-0007-2015.

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

Albillos A, Martin-Mateos R, Van der Merwe S, Wiest R, Jalan R, Álvarez-Mon M. Cirrhosis-associated immune dysfunction. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2022 Feb;19(2):112-134. doi: 10.1038/s41575-021-00520-7.

Ayee R, Ofori MEO, Wright E, Quaye O. Epstein Barr Virus Associated Lymphomas and Epithelia Cancers in Humans. *J Cancer*. 2020 Jan 17;11(7):1737-50. doi: 10.7150/jca.37282.

Birlea M, Cohrs RJ, Bos N, Mehta SK, Pierson DL, Gilden D. Search for varicella zoster virus DNA in saliva of healthy individuals aged 20-59 years. *J Med Virol*. 2014 Feb;86(2):360-2. doi: 10.1002/jmv.23834. Epub 2013 Nov 6.

Boulanger E. L'herpèsvirus humain 8 (HHV8). II. Rôle pathogène et sensibilité aux antiviraux [Human herpesvirus 8 (HHV8). II. Pathogenic role and sensitivity to antiviral drugs]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1999 Jan-Feb;57(1):19-28.

Cohen JI. Herpesvirus latency. *J Clin Invest*. 2020 Jul 1;130(7):3361-3369. doi: 10.1172/JCI136225.

Correa Sierra CB, Kourí Cardellá V, Pérez Santos L, Silverio CE, Hondal N, Florin J. Herpesviruses excretion in saliva of pediatric transplant recipients. *Transpl Infect Dis*. 2017 Dec;19(6). doi: 10.1111/tid.12771.

Corstjens PL, Abrams WR, Malamud D. Detecting viruses by using salivary diagnostics. *J Am Dent Assoc*. 2012 Oct;143(10 Suppl):12S-8S. doi: 10.14219/jada.archive.2012.0338.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Corstjens PL, Abrams WR, Malamud D. Saliva and viral infections. *Periodontol* 2000. 2016 Feb;70(1):93-110. doi: 10.1111/prd.12112.

Costa ALF, Santos BA, Torregrossa VR, Miranda ECM, Vigorito AC, Palmieri M, Ricardo ALF, Sarmiento DJS, Mamana AC, Tozetto-Mendoza TR, Correa MEP, Braz-Silva PH. Oral shedding of CMV and HSV-1 in hematopoietic stem cell transplantation patients. *Oral Dis.* 2021 Sep;27(6):1572-1579. doi: 10.1111/odi.13690.

Crimi S, Fiorillo L, Bianchi A, D'Amico C, Amoroso G, Gorassini F, Mastroieni R, Marino S, Scoglio C, Catalano F, Campagna P, Bocchieri S, De Stefano R, Fiorillo MT, Ciccì M. Herpes Virus, Oral Clinical Signs and QoL: Systematic Review of Recent Data. *Viruses.* 2019 May 21;11(5):463. doi: 10.3390/v11050463.

Elkrief L, Rautou PE, Sarin S, Valla D, Paradis V, Moreau R. Diabetes mellitus in patients with cirrhosis: clinical implications and management. *Liver Int.* 2016 Jul;36(7):936-48. doi: 10.1111/liv.13115. Epub 2016 Apr 4.

El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* 2011;365:1118-27. doi:10.1056/NEJMra1001683

Figueiredo MA, Domingues Fink MC, Castro T, Braz-Silva PH, Steffens JC, Eduardo FP, et al. Detection of human polyomaviruses JC and BK in liver pretransplant patients. *Oral Dis.* 2017;23(8):1127-33.

Fouad TR, Abdelsameea E, Abdel-Razek W, Attia A, Mohamed A, Metwally K, Naguib M, Waked I. Upper gastrointestinal bleeding in Egyptian patients with cirrhosis: Post-therapeutic outcome and prognostic indicators. *J Gastroenterol Hepatol.* 2019 Sep;34(9):1604-1610. doi: 10.1111/jgh.14659.

Garcia-Tsao G, Friedman S, Iredale J, Pinzani M. Now there are many (stages) where before there was one: In search of a pathophysiological classification of cirrhosis. *Hepatology.* 2010 Apr;51(4):1445-9. doi: 10.1002/hep.23478.

Garren MR, Ashcraft M, Qian Y, Douglass M, Brisbois EJ, Handa H. Nitric oxide and viral infection: Recent developments in antiviral therapies and platforms. *Appl Mater Today.* 2021 Mar;22:100887. doi: 10.1016/j.apmt.2020.100887.

Geris JM, Spector LG, Roesler M, Hernandez-Alvarado N, Blackstad M, Nelson HH, Schleiss MR. High prevalence of asymptomatic CMV shedding in healthy children attending the minnesota state fair. *J Clin Virol.* 2022 Mar;148:105102. doi: 10.1016/j.jcv.2022.105102.

Ginès P, Fernández J, Durand F, Saliba F. Management of critically-ill cirrhotic patients. *J Hepatol.* 2012;56 Suppl 1:S13-24. doi: 10.1016/S0168-8278(12)60003-8.

Ginès P, Krag A, Abraldes JG, Solà E, Fabrellas N, Kamath PS. Liver cirrhosis. *Lancet.* 2021 Oct 9;398(10308):1359-1376. doi: 10.1016/S0140-6736(21)01374-X.

Goodrum F. The complex biology of human cytomegalovirus latency. *Adv Virus Res.* 2022;112:31-85. doi: 10.1016/bs.aivir.2022.01.001.

Hadinoto V, Shapiro M, Sun CC, Thorley-Lawson DA. The dynamics of EBV shedding implicate a central role for epithelial cells in amplifying viral output. *PLoS Pathog.* 2009 Jul;5(7):e1000496. doi: 10.1371/journal.ppat.1000496.

Ho DY, Enriquez K, Multani A. Herpesvirus Infections Potentiated by Biologics. *Infect Dis Clin North Am.* 2020 Jun;34(2):311-339. doi: 10.1016/j.idc.2020.02.006.

Houen G, Trier NH. Epstein-Barr Virus and Systemic Autoimmune Diseases. *Front Immunol.* 2021 Jan 7;11:587380. doi: 10.3389/fimmu.2020.587380.

Huynh GT, Rong L. Modeling the dynamics of virus shedding into the saliva of Epstein-Barr virus positive individuals. *J Theor Biol.* 2012 Oct 7;310:105-14. doi: 10.1016/j.jtbi.2012.05.032.

Irvine KM, Ratnasekera I, Powell EE, Hume DA. Causes and Consequences of Innate Immune Dysfunction in Cirrhosis. *Front Immunol.* 2019 Feb 25;10:293. doi: 10.3389/fimmu.2019.00293. Erratum in: *Front Immunol.* 2019 Apr 09;10:818.

Iwakiri Y, Trebicka J. Portal hypertension in cirrhosis: Pathophysiological mechanisms and therapy. *JHEP Rep.* 2021 Jun 4;3(4):100316. doi: 10.1016/j.jhepr.2021.100316.

Jeker R. Hypersplenismus [Hypersplenism]. *Ther Umsch.* 2013 Mar;70(3):152-6. German. doi: 10.1024/0040-5930/a000383.

Johnson G, Nelson S, Petric M, Tellier R. Comprehensive PCR-based assay for detection and species identification of human herpesviruses. *J Clin Microbiol*. 2000 Sep;38(9):3274-9. doi: 10.1128/JCM.38.9.3274-3279.2000.

Jung GE, Encke J, Schmidt J, Rahmel A. Model for end-stage liver disease. *Neue Grundlage der Allokation für die Lebertransplantation [Model for end-stage liver disease. New basis of allocation for liver transplantations]*. *Chirurg*. 2008 Feb;79(2):157-63. German. doi: 10.1007/s00104-008-1463-4.

Kennedy PGE. An overview of viral infections of the nervous system in the immunosuppressed. *J Neurol*. 2021 Aug;268(8):3026-3030. doi: 10.1007/s00415-020-10265-z.

Kerr JR. Epstein-Barr virus (EBV) reactivation and therapeutic inhibitors. *J Clin Pathol*. 2019 Oct;72(10):651-658. doi: 10.1136/jclinpath-2019-205822.

Kosaka T, Kokubo Y, Ono T et al. Salivary inflammatory cytokines may be novel markers of carotid atherosclerosis in a Japanese general population: the Suita study. *Atherosclerosis* 2014;237(1):123.

Krenkel O, Tacke F. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol*. 2017;17:306-21. doi: 10.1038/nri.2017.11

Kubes P, Jenne C. Immune Responses in the Liver. *Annu Rev Immunol*. 2018 Apr 26;36:247-277. doi: 10.1146/annurev-immunol-051116-052415.

Lombardo L, Capaldi A, Poccardi G, Vineis P. Peripheral blood CD3 and CD4 T-lymphocyte reduction correlates with severity of liver cirrhosis. *International Journal of Clinical and Laboratory Research*, 1995;25:153-6.

Mansour D, McPherson S. Management of decompensated cirrhosis. *Clin Med (Lond)*. 2018 Apr 1;18(Suppl 2):s60-s65. doi: 10.7861/clinmedicine.18-2-s60.

Marcellin P, Kutala BK. Liver diseases: A major, neglected global public health problem requiring urgent actions and large-scale screening. *Liver Int*. 2018;38:Suppl 1:2-6. doi:10.1111/liv.13682

Miller CS, Danaher RJ. Asymptomatic shedding of herpes simplex virus (HSV) in the oral cavity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008 Jan;105(1):43-50. doi: 10.1016/j.tripleo.2007.06.011.

Miranda-Silva W, de Molla VC, Knebel FH, Tozetto-Mendoza TR, Arrais-Rodrigues C, Camargo AA, Braz-Silva PH, Fregnani ER. Oral shedding of herpesviruses and clinical outcomes in hematopoietic stem cell transplant patients. *Oral Dis*. 2021 Sep 14. doi: 10.1111/odi.14022.

Miranda-Silva W, Knebel FH, Tozetto-Mendoza TR, Palmieri M, da Fonseca FP, Camargo AA, Braz-Silva PH, Fregnani ER. Herpesviruses in the oral cavity of patients subjected to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and its relationship with oral mucositis. *Clin Oral Investig*. 2020 Oct;24(10):3597-3608. doi: 10.1007/s00784-020-03234-3.

Mueller SN, Rouse BT. Immune responses to viruses. *Clinical Immunology*. 2008;421–31. doi: 10.1016/B978-0-323-04404-2.10027-2.

Newton R, Labo N, Wakeham K, Marshall V, Roshan R, Nalwoga A, Sebina I, Muhangi L, Webb EL, Miley W, Rochford R, Elliott AM, Whitby D. Determinants of Gammaherpesvirus Shedding in Saliva Among Ugandan Children and Their Mothers. *J Infect Dis*. 2018 Aug 14;218(6):892-900. doi: 10.1093/infdis/jiy262.

Nguyen-Lefebvre AT, Horuzsko A. Kupffer Cell Metabolism and Function. *J Enzymol Metab*. 2015;1(1):101.

Olde Damink SW, Deutz NE, Dejong CH, Soeters PB, Jalan R. Interorgan ammonia metabolism in liver failure. *Neurochem Int*. 2002 Aug-Sep;41(2-3):177-88. doi: 10.1016/s0197-0186(02)00040-2.

Palmieri M, Ornaghi M, Martins VAO, Correa L, Brandao TB, Ribeiro ACDP, 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(1):1476643. doi: 10.1080/20002297.2018.1476643. Erratum in: *J Oral Microbiol*. 2021 Mar 29;12(1):1890442.

Parola M, Pinzani M. Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues. *Mol Aspects Med*. 2019 Feb;65:37-55. doi: 10.1016/j.mam.2018.09.002..

Patel SS, Singh S, Sahu C, Ghoshal U, Verma H. A three year Seroepidemiological and molecular study of Epstein -Barr virus infection among different age groups with hematological malignancies in a Tertiary care centre of North India (2017 -2019). *J Family Med Prim Care*. 2021 Jan;10(1):373-377. doi: 10.4103/jfmpc.jfmpc_1594_20.

Pinzani M, Rosselli M, Zuckermann M. Liver cirrhosis. *Best Practice Res. Clin.Gastroent.* 2011;25(2):281-90.

Raposo JV, Sarmiento DJS, Pinto RBDS, Lopes AO, Gallottini M, Tozetto-Mendoza TR, Braz-Silva PH, de Paula VS. Longitudinal study on oral shedding of human betaherpesviruses 6 and 7 in renal transplant recipients reveals active replication. *J Oral Microbiol.* 2020 Jun 30;12(1):1785801. doi: 10.1080/20002297.2020.1785801.

Rechenchoski DZ, Faccin-Galhardi LC, Linhares REC, Nozawa C. Herpesvirus: an underestimated virus. *Folia Microbiol (Praha).* 2017 Mar;62(2):151-156. doi: 10.1007/s12223-016-0482-7.

Rosselli M, MacNaughtan J, Jalan R, Pinzani M. Beyond scoring: a modern interpretation of disease progression in chronic liver disease. *Gut.* 2013;62:1234-41. doi:10.1136/gutjnl-2012-302826

Sarmiento DJS, Caliento R, Souza AO, Tozetto-Mendoza TR, Palmieri M, Martins VAO, et al. Salivary shedding of herpesviruses in renal transplant recipients. *J Investig Clin Dent.* 2018;9(4):e12356.

Satish BN, Srikala P, Maharudrappa B et al. Saliva: a tool in assessing glucose levels in diabetes mellitus. *J Int Oral Health* 2014; 6 (2): 114–117.

Shenoda B, Boselli J. Vascular syndromes in liver cirrhosis. *Clin J Gastroenterol.* 2019 Oct;12(5):387-97. doi: 10.1007/s12328-019-00956-0.

Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver. *Curr Biol.* 2017;27(21):R1147-R51.

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

van der Beek MT, Laheij AM, Raber-Durlacher JE, von dem Borne PA, Wolterbeek R, van der Blij-de Brouwer CS, et al. Viral loads and antiviral resistance of herpesviruses and oral ulcerations in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* 2012 Sep;47(9):1222-8. doi: 10.1038/bmt.2012.2.

van Velzen M, Ouwendijk WJ, Selke S, Pas SD, van Loenen FB, Osterhaus AD, et al. Longitudinal study on oral shedding of herpes simplex virus 1 and varicella-zoster virus in individuals infected with HIV. *J Med Virol*. 2013 Sep;85(9):1669-77. doi: 10.1002/jmv.23634.

Wang CC, Yepes LC, Danaher RJ, Berger JR, Mootoor Y, Kryscio RJ, et al. Low prevalence of varicella zoster virus and herpes simplex virus type 2 in saliva from human immunodeficiency virus-infected persons in the era of highly active antiretroviral therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010 Feb;109(2):232-7. doi: 10.1016/j.tripleo.2009.08.037.

Wang Y, Springer S, Mulvey CL, Silliman N, Schaefer J, Sausen M, et al. Detection of somatic mutations and HPV in the saliva and plasma of patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Sci Transl Med*. 2015 Jun 24;7(293):293ra104. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa8507.

Weersink RA, Burger DM, Hayward KL, Taxis K, Drenth JPH, Borgsteede SD. Safe use of medication in patients with cirrhosis: pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2020 Jan;16(1):45-57. doi: 10.1080/17425255.2020.1702022.

Weinzirl J, Garnitschnig L, Scheffers T, Andrae L, Heusser P. Splenic Rhythms and Postprandial Dynamics in Physiology, Portal Hypertension, and Functional Hyposplenism: A Review. *Digestion*. 2021;102(3):326334. doi: 10.1159/000507346.

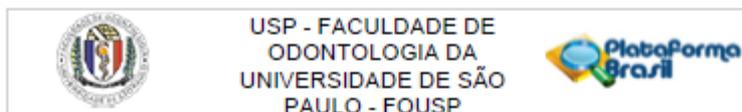
Wong Y, Meehan MT, Burrows SR, Doolan DL, Miles JJ. Estimating the global burden of Epstein-Barr virus-related cancers. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2022 Jan;148(1):31-46. doi: 10.1007/s00432-021-03824-y.

Xiao H, Hu B, Luo R, Hu H, Zhang J, Kuang W, Zhang R, Li L, Liu G. Chronic active Epstein-Barr virus infection manifesting as coronary artery aneurysm and uveitis. *Virol J*. 2020 Oct 29;17(1):166. doi: 10.1186/s12985-020-01409-8.

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 Mar;86(3):505-11. doi: 10.1002/jmv.23782.

Zhang CZ, Cheng XQ, Li JY, Zhang P, Yi P, Xu X, Zhou XD. Saliva in the diagnosis of diseases. *Int J Oral Sci*. 2016 Sep 29;8(3):133-7. doi: 10.1038/ijos.2016.38.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de poliomavírus, herpesvírus e torque teno vírus em sangue e saliva de pacientes cirróticos.

Pesquisador: Karen López Ortega

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 29423520.8.0000.0075

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.895.067

Apresentação do Projeto:

Pacientes cirróticos em fila de transplante hepático possuem inúmeros prejuízos em vias fisiológicas, como a evidente deficiência imune. O dano ao sistema reticuloendotelial, o comprometimento das vias e células de defesa tornam o paciente cirrótico mais propenso ao desenvolvimento de infecções que influem em sua qualidade de vida e podem piorar o seu prognóstico. Além disso, a existência de compostos tóxicos não excretados pelo fígado cirrótico podem favorecer quadros inflamatórios e a latência viral. Dessa forma, nota-se a importância da detecção dos níveis de vírus latentes nesse grupo de pacientes e sua possível relação com o quadro de imunossupressão.

Objetivo da Pesquisa:

Identificar e quantificar poliomavírus (BKV e JCV), herpes vírus e torque tenovírus em amostras de saliva e sangue de pacientes cirróticos em fila de transplante.

- 1) Verificar se a saliva pode ser um bom fluido para o diagnóstico desses vírus;
- 2) Identificar se a presença e os níveis desses vírus estão relacionados com a população de leucócitos circulantes, etiologia da cirrose e complicações da cirrose

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos. Como não há a identificação dos pacientes nos frascos de sangue e saliva

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227 - 1º andar, sala 02 da administração
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefons: (11)3091-7960 Fax: (11)3091-7960 E-mail: cepfo@usp.br



USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FOU SP



Continuação do Parecer: 3.095.007

coletados, tampouco há risco de identificação dos pacientes. As informações clínicas que serão acessadas foram transferidas dos prontuários dos pacientes para uma ficha clínica que foi desenvolvida especificamente para o estudo anterior (CAAE 70741017.1.0000.0066; número do Parecer: 2.181.425) e também não possuem

identificação do paciente.

Benefícios:

Não há benefícios diretos para o paciente. Os benefícios estão vinculados a agregar conhecimento a área de pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O desenho da pesquisa é apropriado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram apresentados de forma correta.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

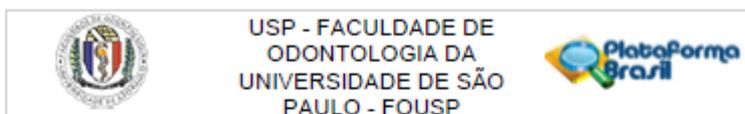
Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1506245.pdf	21/02/2020 13:02:46		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.pdf	21/02/2020 13:02:05	GABRIELLA BUENO MARINHO	Aceito
Folha de Rosto	FDR.pdf	21/02/2020 12:58:30	GABRIELLA BUENO MARINHO	Aceito

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227 - 1º andar, sala 02 de administração
Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 Fax: (11)3091-7960 E-mail: cepto@usp.br



Continuação do Parecer: 3.026.007

Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_2181425.pdf	13/02/2020 13:59:16	GABRIELLA BUENO MARINHO	Aceito
Parecer Anterior	PARECERICHC.pdf	13/02/2020 13:59:06	GABRIELLA BUENO MARINHO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	BIOBANCO.pdf	13/02/2020 13:58:48	GABRIELLA BUENO MARINHO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 03 de Março de 2020

Assinado por:
Margareth Oda
(Coordenador(a))

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227 - 1º andar, sala 02 da administração
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)3091-7960 Fax: (11)3091-7960 E-mail: cepfo@usp.br