

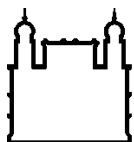
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Medicina Tropical

DETECÇÃO DE *CITOMEGALOVIRUS*, *HERPESVIRUS HUMANO 6 E*  
*HERPESVIRUS HUMANO 7* EM AMOSTRAS DE LESÕES DE  
GLÂNDULA SALIVAR PARAFINADAS

ANA CAROLINA SILVA GUIMARÃES

Rio de Janeiro  
Maio de 2021



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

*ANA CAROLINA SILVA GUIMARÃES*

*DETECÇÃO DE CITOMEGALOVIRUS, HERPESVIRUS HUMANO 6 E  
HERPESVIRUS HUMANO 7 EM AMOSTRAS DE LESÕES DE GLÂNDULA SALIVAR  
PARAFINADAS*

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo  
Cruz como parte dos requisitos para obtenção do  
título de Mestre em Medicina Tropical

**Orientador (es):** Prof. Dra. Vanessa Salete de Paula

**RIO DE JANEIRO**

Maio de 2021

Guimarães, Ana Carolina Silva.

Detecção de *Citomegalovírus*, *Herpesvirus Humano 6* e *Herpesvirus humano 7* em amostras de glândulas salivares parafinadas / Ana Carolina Silva Guimarães. - Rio de Janeiro, 2021.

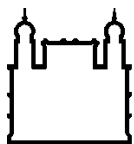
84 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2021.

Orientadora: Vanessa Salete de Paula.

Bibliografia: f. 54-63

1. Neoplasias salivares. 2. glândulas salivares. 3. detecção viral. 4. tecido parafinado. 5. betaherpesvírus. I. Título.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

***AUTOR: ANA CAROLINA SILVA GUIMARÃES***

*DETECÇÃO DE CITOMEGALOVIRUS, HERPESVIRUS HUMANO 6 E  
HERPESVIRUS HUMANO 7 EM AMOSTRAS DE LESÕES DE GLÂNDULA  
SALIVAR PARAFINADAS*

**ORIENTADORA:** Dra. Vanessa Salete de Paula

Aprovada em: **03/05/2021**

**BANCA EXAMINADORA:**

Dra. Monick Lindenmeyer Guimarães - **Presidente** (Instituto Oswaldo Cruz – IOC/FIOCRUZ)

Dr. Marcelo Pelajo (Instituto Oswaldo Cruz – IOC/FIOCRUZ)

Dra. Karem López Ortega (Universidade de São Paulo - USP)

**SUPLENTES:**

Dra. Bárbara Cristina Euzebio Pereira Dias de Oliveira (Instituto Oswaldo Cruz – IOC/FICORUZ)

Dra. Marcelle Bottecchia Coelho Branco (Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro– UNIRIO)

Rio de Janeiro, 03 de maio de 2021



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado acadêmico em Medicina Tropical de **Ana Carolina Silva Guimarães**, sob orientação da Dra. Vanessa Salete de Paula. Ao terceiro dia do mês de maio de dois mil vinte e um, realizou-se às nove horas e trinta minutos, de forma síncrona remota, o exame da dissertação de mestrado acadêmico intitulada: **“Detecção de Citomegalovírus, Herpesvírus humano 6 e Herpesvírus humano 7 em amostras de lesões de glândula salivar parafinadas”**, no Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Diagnóstico, Epidemiologia e Controle, na linha de pesquisa: Epidemiologia e Controle de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr<sup>a</sup>. Monick Lindenmeyer Guimarães – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Marcelo Pelajo Machado – IOC/FIOCRUZ, Dr<sup>a</sup>. Karem López Ortega – USP/SP e como suplentes: Dr<sup>a</sup>. Bárbara Cristina Euzébio Pereira Dias de Oliveira – IOC/FIOCRUZ e Dr<sup>a</sup>. Marcelle Bottecchia Coelho Branco – UNIRIO/RJ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela aprovação da defesa da dissertação de mestrado acadêmico. De acordo com o regulamento do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Presidente da Banca atesta a decisão e a participação da aluna e de todos os membros da banca de forma síncrona remota. A Coordenadora do Programa Dr<sup>a</sup>. Vanessa Salete de Paula, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 03 de maio de 2021.

Dr<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Monick Lindenmeyer Guimarães (Presidente da Banca):

Dr<sup>a</sup>. Vanessa Salete de Paula (Coordenadora do Programa):

Dedico a todos os profissionais da saúde que dedicam suas vidas ao combate à pandemia causada pelo SARS-CoV-2.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, meu Pai e criador de todas as coisas, por ter me sustentado e me dado sabedoria. Sem Ele eu não seria nada e não teria chegado até aqui.

À Dra. Vanessa, melhor orientadora do mundo e minha inspiração, tanto como pessoa como cientista. Obrigada por ter sempre confiado no meu potencial, desde a minha iniciação científica, e nunca ter desistido de mim, por ser importar com todos os alunos e ser essa mãezona, sempre trazendo a sensação de calma, mesmo quando estamos desesperados com essa vida de “gente grande”.

À melhor equipe de laboratório que eu poderia ter, LVM é uma segunda família que eu pude a oportunidade de ter. Em especial à Jéssica Raposo e Camilla Rodrigues, por terem me auxiliado a detectar todos os betaherpêsvírus e nas análises desse trabalho, meu muitíssimo obrigada por serem quem são. Sou muito grata por ter pessoas incríveis e que contribuem tanto no meu crescimento profissional e pessoal. Aprendi a fazer pesquisa com vocês e aprendi a trabalhar em equipe. Muito obrigada por terem me acolhido.

Ao Dr. Paulo Braz e toda a equipe da USP por ter aceitado colaborar conosco, pela paciência e por todo o companheirismo. Ainda acredito que vamos descobrir a causa etiológica de lesões salivares e seremos referência mundial!

À equipe do laboratório de Patologia da Fiocruz, especialmente ao Dr. Marcelo Pelajo e a Dra. Bárbara Cristina de Oliveira. Obrigada por terem me ensinado tanto, por terem me ajudado na extração das minhas amostras e por me fazer descobrir que eu amo ficar no laboratório colorindo lâmina. Obrigada pelas saídas e pelas idas até a “tia do bolo”, amo vocês.

À minha mãe, minha musa inspiradora e minha melhor amiga, por sempre me apoiar e por estar do meu lado em todos os momentos da minha vida. Obrigada por ser minha mãezinha, te amo mil milhões. À minha irmãzinha que pela curiosidade no meu trabalho, mesmo sendo uma criança, me inspirou a querer sempre levar conhecimento a todos, obrigada por existir na minha vida, maninha. Ao meu namorado por sempre estar comigo e por, mesmo não entendo nada, se mostrar interessado em querer saber o que faço dentro do laboratório, obrigada pelas risadas e pelo companheirismo, meu amor.

Ao meu amigo/irmão, Marlon, por ter sido sempre aquela pessoa que esteve do meu lado, independente da circunstância. Obrigada por ser meu melhor amigo e por ter me aguentado nas minhas crises de cansaço e estresse.

Aos meus amigos que sempre me apoiaram e sempre estiveram do meu lado, mesmo longe, tenham certeza que iremos aglomerar quando o “coronildes” passar. “Ohana quer dizer família”.

Aos meus amigos/irmãos que a Medicina Tropical me deu, eu não teria conseguido passar por todo o cansaço, suor e lágrimas sem vocês. Obrigada por deixarem meus dias mais leves mesmo com aulas inacabáveis e por toda a amizade. Com toda certeza, vocês são parte imprescindível da minha vida e levarei todos vocês comigo, independentemente de onde eu esteja. O jeito como a gente ataca a comida é diferente, para sempre “farelos”.

Gostaria de agradecer aos membros que aceitaram fazer parte da minha banca de defesa, por dedicarem o seu tempo e por todas as arguições e sugestões, com toda certeza foram importantes no meu crescimento profissional e formação de novas ideias e hipóteses para futuros trabalhos. Especialmente à Dra. Monick Lindenmeyer Guimarães pela dedicação pelo seu papel de revisora além de também ser presidente da banca.

Gostaria de agradecer ao programa de Medicina Tropical por ter confiado no meu trabalho e me permitir realizá-lo. Obrigada por ter contribuído tanto no meu crescimento profissional e ter mostrado que ciência vai além da bancada.

Por fim, gostaria de agradecer as agências de fomentos pela bolsa CAPES, FAPERJ e CNPq pelo financiamento do projeto.

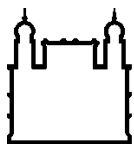
Que continuemos levando conhecimento além dos horizontes. Que a ciência brasileira seja reconhecida.

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



“Eu sou minha única musa, o assunto que  
conheço melhor”.

Frida Kahlo



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

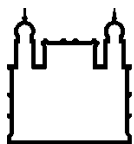
DETECÇÃO DE CITOMEGALOVIRUS, HERPESVIRUS HUMANO 6 E HERPESVIRUS HUMANO 7  
EM AMOSTRAS DE LESÕES EM GLÂNDULA SALIVAR PARAFINADAS

### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Ana Carolina Silva Guimarães

Os vírus têm sido considerados como importantes patógenos no desenvolvimento de neoplasias em glândulas salivares, dentre estes, destacam-se os *Betaherpesvirus humano* como o *Citomegalovirus humano* (HCMV), *Herpesvirus humano 6* (HHV-6) e *Herpesvirus humano 7* (HHV-7). Os betaherpesvírus são característicos por apresentarem alta prevalência na população mundial, sem apresentar sazonalidade, capazes de causar infecção latente e reativação viral em seus hospedeiros. Devido a detecção destes vírus em amostras de saliva, tem sido proposto em alguns estudos a ação de betaherpesvírus em algumas patologias de glândulas salivares, como a formação de patologias nestes órgãos. Neoplasias em glândulas salivares representam cerca de 3-6% de todas as neoplasias de cabeça e pescoço, com incidência mundial anual de aproximadamente 0,4-13,5% por 100.000 indivíduos. Apesar de haver dados de detecção de betaherpesvírus em neoplasias salivares e em amostras de saliva, ainda existem estudos insuficientes que explorem o papel destes vírus nestas patologias salivares. O objetivo deste estudo foi investigar a presença dos *Betaherpesvirus humano* (HCMV, HHV-6 e HHV-7) em neoplasias de glândula salivar parafinadas. Um ensaio de qPCR foi realizado para amplificação das regiões U54, U56 e U37 do HCMV, HHV-6 e HHV-7, respectivamente para quantificar a carga viral em 68 amostras parafinadas de lesões salivares. Dentre as 68 amostras processadas, 51,4% eram de mucocele (35/68), 39,7% de adenoma pleomórfico (27/68) e 8,8% de carcinoma mucoepidermoíde (6/68). A detecção de betaherpesvírus nestas lesões foi alta, apresentando maior detecção para HCMV com 52,9%, 47,05% para HHV-6 e 39,7% para HHV-7, possuindo predominância de detecção de betaherpesvírus na lesão do tipo adenoma pleomórfico. Foi observado que 50,0% das amostras apresentaram tripla-infecção por HCMV/HHV-6/HHV-7, sendo detectado 20,0% de coinfeções por HCMV/HHV-6, 20,0% de HCMV/HHV-7 e 10,0% de HHV-6/HHV-7, com coinfeções ocorrendo na lesão do tipo adenoma pleomórfico em maior taxa. A alta detecção de HCMV, HHV-6 e HHV-7 em glândulas salivares, indica que este órgão pode ser possível de sítio de replicação destes vírus.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

DETECTION OF CYTOMEGALOVIRUS, HUMAN HERPESVIRUS 6, HUMAN HERPESVIRUS 7 IN  
SALIVARY GLANDS LESIONS PARAFFIN EMBEDDED SAMPLES

### ABSTRACT

#### MASTER DISSERTATION IN MEDICINA TROPICAL

Ana Carolina Silva Guimarães

The viruses have been considered as important pathogens in the development of neoplasms in salivary glands, between these, *Human betaherpesvirus* such as *Human cytomegalovirus* (HCMV), *Human herpesvirus 6* (HHV-6) and *Human herpesvirus 7* (HHV-7) stand out. Betaherpesvirus is characteristic because they have a high prevalence in the world population, without presenting seasonality, capable of causing latent infection and viral reactivation in their hosts. Due to the detection of these viruses in saliva samples, the action of betaherpesvirus in some pathogenesis of salivary glands, such as the formation of pathogenesis in these organs, has been proposed in some studies. Salivary gland neoplasms account for about 3-6% of all head and neck neoplasms, with an annual worldwide incidence of approximately 0,4-13,5% per 100,000 individuals. Although there are data for the detection of betaherpesvirus in salivary neoplasms and saliva samples, there are still insufficient studies exploring the role of these viruses in these salivary pathogenesises. The aim of this study was to investigate the presence of human *Betaherpesvirus* (HCMV, HHV-6 and HHV-7) in paraffin salivary gland neoplasms. A qPCR assay was performed to amplify the U54, U56 and U37 regions of HCMV, HHV-6 and HHV-7, respectively to quantify the viral load in 68 paraffin samples of salivary lesions. Among the 68 samples processed, 51,4% were mucocele (35/68), 39,7% pleomorphic adenoma (27/68) and 8,8% mucoepidermoid carcinoma (6/68). The detection of betaherpesvirus in these lesions was high, presenting higher detection for HCMV with 52,9%, 47,05% for HHV-6 and 39,7% for HHV-7, with predominance of detection of betaherpesvirus in the lesion of the pleomorphic adenoma type. It was observed that 50.0% of the samples presented triple-infection by HCMV/HHV-6/HHV-7, and 20.0% of co-infections by HCMV/HHV-6, 20.0% of HCMV/HHV-7 and 10.0% of HHV-6/HHV-7 were detected, with co-infections occurring with higher predominance of pleomorphic adenoma lesion. The high detection of HCMV, HHV-6 and HHV-7 in salivary glands indicates that this organ may be possible from replication site.

# ÍNDICE

Resumo.....	IX
Abstract.....	X
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Família Herpesviridae</b> .....	<b>2</b>
1.2 Características morfológicas e genômicas dos betaherpesvírus.....	3
1.3 Processo de replicação viral dos herpesvírus.....	5
1.4 Mecanismo de latência e reativação dos betaherpesvírus	8
1.5 Características e manifestações clínicas dos <i>Betaherpesvírus humano</i> .....	11
1.5.1 Betaherpesvírus humano 5 ou Citomegalovírus humano (HCMV).....	11
1.5.2 Betaherpesvirus humano 6A e 6B (HHV-6A/B).....	13
1.5.3 Betaherpesvirus humano 7 (HHV-7).....	16
1.6 Epidemiologia das infecções causadas por betaherpesvírus.....	17
1.7 Diagnóstico e tratamento das infecções causadas por betaherpesvirus.....	19
1.8 Aspectos anatômicos de glândulas salivares.....	22
1.9 Histologia, apresentações clínicas e epidemiologia de tumores em glândulas salivares.....	23
1.9.1 Neoplasia benigna: adenoma pleomórfico.....	25
1.9.2 Neoplasia maligna: carcinoma mucoepidermóide.....	26
1.9.3 Lesão não neoplásica: mucocele.....	27
1.10 Aspectos epidemiológicos de neoplasias em glândulas salivares.....	28
1.11 Detecção de betaherpesvírus em glândulas salivares....	30
<b>2. Justificativa</b> .....	<b>32</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
3.2 Objetivo Geral.....	33
3.3 Objetivos Específicos.....	33

<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>34</b>
4.1 Descrição da população de estudo.....	34
4.2 Extração de ácido nucleico .....	34
4.3 Ensaio de PCR em tempo real .....	37
4.4 Análise estatística.....	39
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>40</b>
5.1 Perfil sociodemográfico e clínico de indivíduos com lesões em glândulas salivares .....	40
5.3 Análises entre as detecções de Betaherpesvírus humano e os tipos de lesões em glândulas salivares.....	44
5.4 Comparação das taxas de coinfeções e monoinfeções entre HCMV, HHV-6 e HHV-7 entre as lesões em glândulas salivares.....	45
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>48</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b>	<b>53</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>54</b>

## ANEXOS

<b>Anexo I – Parecer do Comitê de Ética.....</b>	<b>64</b>
--	-----------

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1 - Estrutura morfológica e genômica dos betaherpesvírus.....</b>	<b>5</b>
<b>Figura 1.2 - Vias de entrada dos herpesvírus.....</b>	<b>6</b>
<b>Figura 1.3 - Latência celular.....</b>	<b>10</b>
<b>Figura 1.4 - Reativação viral .....</b>	<b>11</b>
<b>Figura 1.5 - Partículas virais do HHV-6 e manifestações clínicas. ....</b>	<b>16</b>
<b>Figura 1.6 - Soroprevalência do HCMV.....</b>	<b>18</b>
<b>Figura 1.7 - Localização e esquematização das glândulas salivares. ....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 1.8- Adenoma pleomórfico e sua forma histológica. ....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 1.9 - Carcinoma mucoepidermoóide em palato duro e forma histológica.....</b>	<b>27</b>
<b>Figura 1.10 - Lesão do tipo mucocela e apresentação histológica .....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 1.11 - Gráfico de incidência mundial de tumores em glândula salivar.....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 1.12 - Gráfico de adenocarcinomas entre os sexos no Reino Unido no período de 1993-1997 .....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 4.13 – Média de HCMV, HHV-6 e HHV-7 em amostras parafinadas de indivíduos com neoplasia em glândula salivar.....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 4.14 - Coinfecções entre HCMV, HHV-6 e HHV-7 nos diferentes tipos de lesões em glândulas salivares.....</b>	<b>46</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Herpesvírus que infectam humanos .....	3
<b>Tabela 2</b> - Células hospedeiras dos betaherpesvírus e locais de latência. ....	9
<b>Tabela 3</b> - Técnicas de diagnóstico laboratorial utilizadas na detecção de Betaherpesvirus humano.....	21
<b>Tabela 4</b> - Sequências de primers, sondas e curvas padrão utilizadas no ensaio de PCR em tempo real (qPCR).....	38
<b>Tabela 5</b> - Termociclagem referente ao ensaio de PCR em tempo real .....	39
<b>Tabela 6</b> - Distribuição das características dos pacientes com lesões em glândula salivar através dos tipos de lesão, p-valor e correlações através do teste de Spearman (r).....	42
<b>Tabela 7</b> - Detecção de HCMV, HHV-6 e HHV-7 entre os pacientes com lesões em glândula salivar .....	44
<b>Tabela 8</b> - Detecção de HCMV, HHV-6 e HHV-7 em lesões de glândula salivar	45
<b>Tabela 9</b> - Coinfecções entre HCMV, HHV-6 e HHV-7 nos diferentes tipos de lesões em glândulas salivares.....	47

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µL - microlitros

µm - micrômetros

µM - micromolar

BKPyV - *Poliomavirus humano BK*

CD134 - cluster de diferenciação 134

CD46 - receptor de agrupamento humano de diferenciação 46

CDC - Centro de Controle de Doenças

ciHHV-6 - *Betaherpesvírus humano 6* integrado ao cromossomo

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EBV - vírus Epstein-Barr

ELISA - do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ou ensaio de imunoabsorção

EMC - encefalomiocardite

EUA - Estados Unidos da América

HBVL - *vírus B-linfotrópico humano*

HCMV - Citomegalovírus humano

HCV - *Hepatite C*

HHV-1 - *Alphaherpesvírus humano 1*

HHV-2 - *Alphaherpesvírus humano 2*

HHV-6 - *Betaherpesvírus humano 6*

HHV-6A - *Betaherpesvírus humano 6A*

HHV-6B - *Betaherpesvírus humano 6B*

HHV-7 - *Betaherpesvírus humano 7*

HHV-8 - *Gammaherpesvírus humano 8*

HIV- *Vírus da Imunodeficiência Humana*

HPV - *Papilomavirus humano*

HTLV - *vírus T-linfotrópico humano*

ICTV - Comitê de Taxonomia de Vírus

IE - Genes imediatos iniciais

JCPyV - *Poliomavirus humano JC*

LATs - genes associados à latência

MCMV - HCMV associado a camundongos

mL - mililitros



NK - Células Natural Killers

nm- nanômetro

OMS - Organização Mundial da Saúde

pb - pares de bases

PCR - Reação em Cadeia de Polimerase

PyV - Poliomavirus associado a camundongos

qPCR- Reação em Cadeia de Polimerase Quantitativa

RNA - Ácido ribonucleico

rpm - rotações por minuto

RT-PCR - Reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase

SNC - Sistema Nervoso Central

TNF- fator de necrose tumoral

UL - Região longa única do inglês *unique long*

US - Região única curta do inglês *short long*

UV - ultra-violeta

VZV - vírus Varicela-Zoster

$\alpha$  - Alfa

$\beta$ - Beta

$\gamma$  - Gama

## 1. INTRODUÇÃO

Neoplasias em glândulas salivares correspondem a lesões incomuns que apresentam vasta variação em relação ao quadro clínico, histológico e aspectos biológicos, apresentando, de forma geral, dificuldades no diagnóstico e na diferenciação de aspectos morfológicos (Da Silva *et al.*, 2018; Cunha *et al.*, 2020). De forma geral, as lesões salivares compreendem cerca de 3% a 6% de todos os tumores de cabeça e pescoço, com incidência global anual de 0.4 a 13.5 casos por 100.000 indivíduos (Tian *et al.*, 2010; Da Silva *et al.*, 2018).

A partir de mudanças no estilo de vida das pessoas e também o crescimento da população idosa, a incidência de tumores em glândulas salivares vêm aumentando gradativamente, porém a etiologia desses tipos de tumores ainda não é bem descrita e definida (Teng *et al.*, 2014). Existem alguns estudos que indicam que o tabagismo, consumo de bebidas alcólicas e histórico de uso de radioterapia são considerados como fatores de risco que levam ao desenvolvimento de tumores em glândulas salivares (Lonn *et al.*, 2006; Teng *et al.*, 2014). Além dos fatores de risco mencionados anteriormente, vale destacar também fatores de risco biológicos e celulares, como alterações nos genes de supressão tumoral, ativação de oncogenes e algumas infecções virais (Jeffers e Cyriaque, 2011; Teng *et al.*, 2014).

Existe uma miríade de vírus que têm sido considerados importantes co-fatores no desenvolvimento de tumores em glândulas salivares (Jeffers e Cyriaque, 2011). Dentre estes vírus, destacam-se os *Betaherpesvírus humanos* como o *Betaherpesvírus humano 6* (HHV-6), *Betaherpesvírus humano 7* (HHV-7) e o *Citomegalovírus humano* (HCMV), que podem ser detectados em glândulas salivares (Wolacewicz *et al.*, 2020; Louten, 2016).

## 1.1 Família *Herpesviridae*

De acordo com o *Comitee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), a família *Herpesviridae*, incorporada na ordem *Herpesvirales*, foi dividida em três subfamílias, sendo estas: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae* (ICTV, 2019). Estas subfamílias foram divididas com base em critérios biológicos, sendo: (1) número de hospedeiros em cultura celular, (2) duração do ciclo replicativo, (3) citopatologia e (4) características de latência celular (Davison, 2014).

A família *Herpesviridae* possui vírus altamente disseminados na natureza e capazes de infectar uma gama de animais (ICTV, 2019). Dentro da família *Herpesviridae*, foram descritos nove vírus capazes de infectar humanos, sendo estes o *Alphaherpesvírus humano 1* (HHV-1) e *Alphaherpesvírus humano 2* (HHV-2), vírus *Varicela-Zoster* (VZV), vírus Epstein-Barr (EBV), Citomegalovírus humano (HCMV), *Betaherpesvírus humano 6A, 6B, 7 e 8* (HHV-6A, HHV-6B, HHV-7 e HHV-8) (Tabela 1).

A subfamília *Alphaherpesvirinae* possui grande número de hospedeiros *in vitro*, possuem curto ciclo de replicação, rápida transmissão com eficiente destruição de células infectadas (lise celular) e, estabelecimento de latência primária em gânglios sensoriais, geralmente em neurônios, tendo como representantes o *Alphaherpesvirus humano 1 e 2* (HHV-1 e HHV-2) e o vírus *Varicela-Zoster* (VZV) (Liu & Zhou, 2007; Davison, 2014). Já a família *Betaherpesvirinae* possui um número limitado de hospedeiros, longo ciclo de replicação viral, transmissão lenta e possui característica de aumento das células infectadas (citomegalia), tendo como local de latência glândulas salivares e células linforeticulares, geralmente em linhagens de monócitos (Davison, 2014). Os representantes dessa subfamília são o *Citomegalovírus humano* (HCMV), *Betaherpesvírus humano 6A, 6B e 7* (HHV-6A, HHV-6B e HHV-7) (Liu & Zhou, 2007).

Por fim, a subfamília *Gammaherpesvirinae* possui vírus que estão associados com doenças linfoproliferativas e que possuem latência em tecidos linfóides, células epiteliais e células fibroblastróides, tendo como representantes o vírus Epstein-Barr (EBV) e o *Gammaherpesvírus humano 8* (HHV-8), responsável pelo Sarcoma de Kaposi (Liu & Zhou, 2007; Davison, 2014). Em modelos *in vitro*, estes vírus conseguem infectar linfócitos B ou T, nos quais a infecção viral é frequentemente interrompida, de modo que a progênie infecciosa não é produzida (Davison, 2014).

**Tabela 1** - Herpesvírus que infectam humanos.

<b>Vírus</b>	<b>Sinônimo</b>	<b>Subfamília</b>	<b>Abreviatura</b>
<i>Alphaherpesvírus humano 1</i>	Vírus herpes simples 1	$\alpha$	HSV-1/ HHV-1
<i>Alphaherpesvírus humano 2</i>	Vírus herpes simples 2	$\alpha$	HSV-1/ HHV-2
<i>Alphaherpesvírus humano 3</i>	Vírus varicela-zoster	$\alpha$	VZV/HHV-3
<i>Gammaherpesvírus humano 4</i>	Vírus Epstein-Barr	$\gamma$	EBV/HHV-3
<i>Betaherpesvírus humano 5</i>	Citomegalovírus humano	$\beta$	HCMV/HHV-5
<i>Betaherpesvírus humano 6A</i>	-	$\beta$	HHV-6A
<i>Betaherpesvírus humano 6B</i>	-	$\beta$	HHV-6B
<i>Betaherpesvírus humano 7</i>	-	$\beta$	HHV-7
<i>Betaherpesvírus humano 8</i>	Herpesvírus associado ao Sarcoma de Kaposi	$\beta$	HHV-8

Fonte: (Lopes, 2016; ICTV, 2019) (Modificado).

## 1.2 Características morfológicas e genômicas dos betaherpesvírus

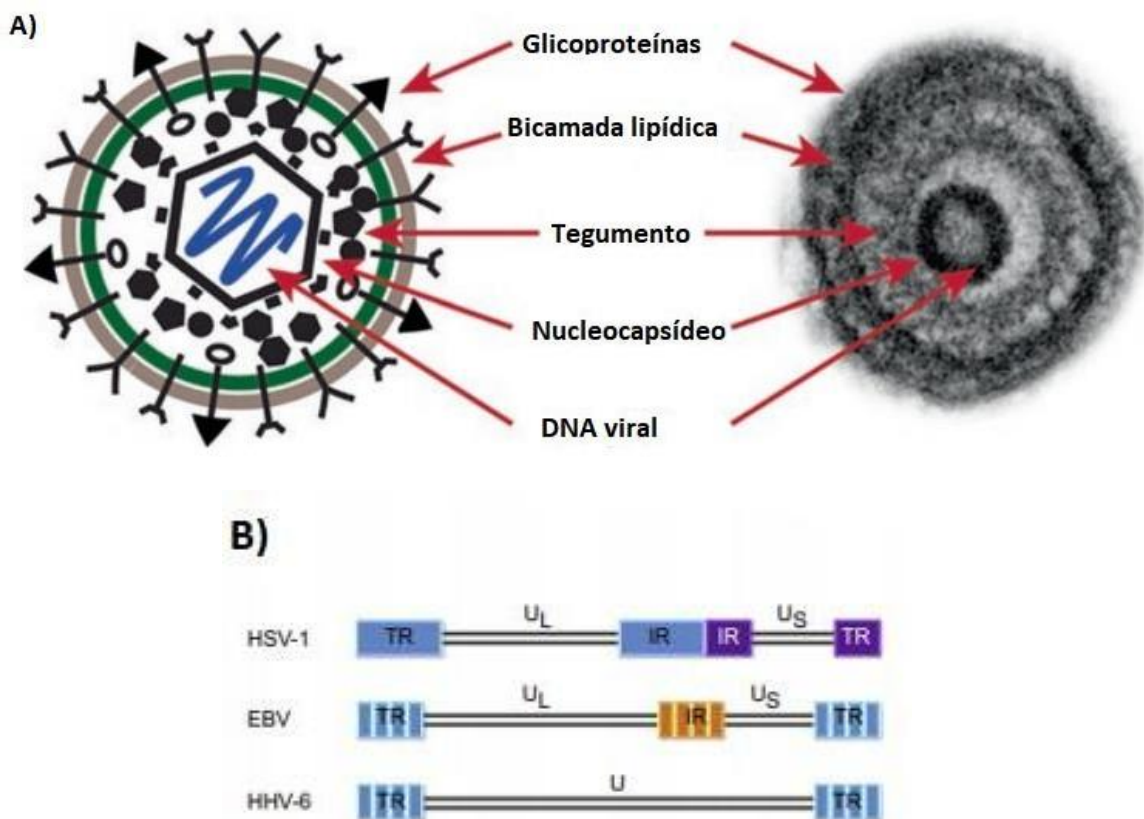
Em geral, os vírus pertencentes à subfamília *Betaherpesvirinae*, assim como os demais herpesvírus, possuem formato esférico e é formado por 4 componentes essenciais: o **nucleocapsídeo** onde fica localizado um **capsídeo** icosaédrico que abriga um DNA de dupla-fita e o **tegumento viral** que está envolto em um **envelope** composto por uma bicamada lipídica que contém glicoproteínas virais, que serão importantes durante a etapa de entrada do vírus na célula hospedeira (Figura 1.1A) (Louten, 2016).

O diâmetro dos betaherpesvírus é de aproximadamente 150-200 nm (Wofford *et al.*, 2020). A região do core consiste em apenas uma cópia de DNA dupla fita, no qual o material genético encontra-se empacotado em alta densidade dentro do capsídeo viral (Davison, 2007). O capsídeo é icosaédrico, possuindo cerca de 125 – 130 nm, sendo constituído por 162 capsômeros (Davison, 2007). Ao entorno do capsídeo, encontra-se o tegumento viral, que é constituído por 30 ou mais glicoproteínas virais que auxiliam no processo de replicação viral (Davison, 2007; Louten, 2016).

O genoma dos vírus pertencentes ao gênero *Roseolavirus*, localizado na subfamília *Betaherpesvirinae*, onde se enquadram o HHV-6A, HHV-6B e HHV-7 são considerados significativamente pequenos, possuindo cerca de 145-162 kb, quando

comparados ao genoma do HCMV, no qual possui 235 pb, considerado como o maior genoma dentre os *Herpesvírus humano* (Davison & Bhella, 2007; Martí-Carreras & Maes, 2019). Este genoma é formado por regiões codificadoras denominadas de “região longa única” – *unique long* (UL) e “região única curta” – *unique short* (US) (Figura 1.1B) (Louten, 2016). As sequências de nucleotídeos repetidas no genoma dos betaherpesvírus se encontram na porção terminal do genoma ou internamente nele, podendo ser repetições diretas ou invertidas (Louten, 2016).

Alguns genes codificadores de proteínas e DNA que codificam transcritos associados à latência (LATs) são encontrados nas sequências promotoras repetidas dos genes UL ou US (Louten, 2016). Como exemplo, os betaherpesvírus possuem alguns genes que estão associados à latência viral, como o gene UL138 do HCMV (Forte *et al.*, 2020), U94 do HHV-6 (Cohen, 2020) e UL28 do HHV-7 (Cohen, 2020). Em geral, o genoma dos betaherpesvírus, assim como a grande maioria dos herpesvírus são capazes de codificar uma gama de proteínas, de plagiar as proteínas das células hospedeiras e interferir na resposta imunológica contra o vírus (Louten, 2016).



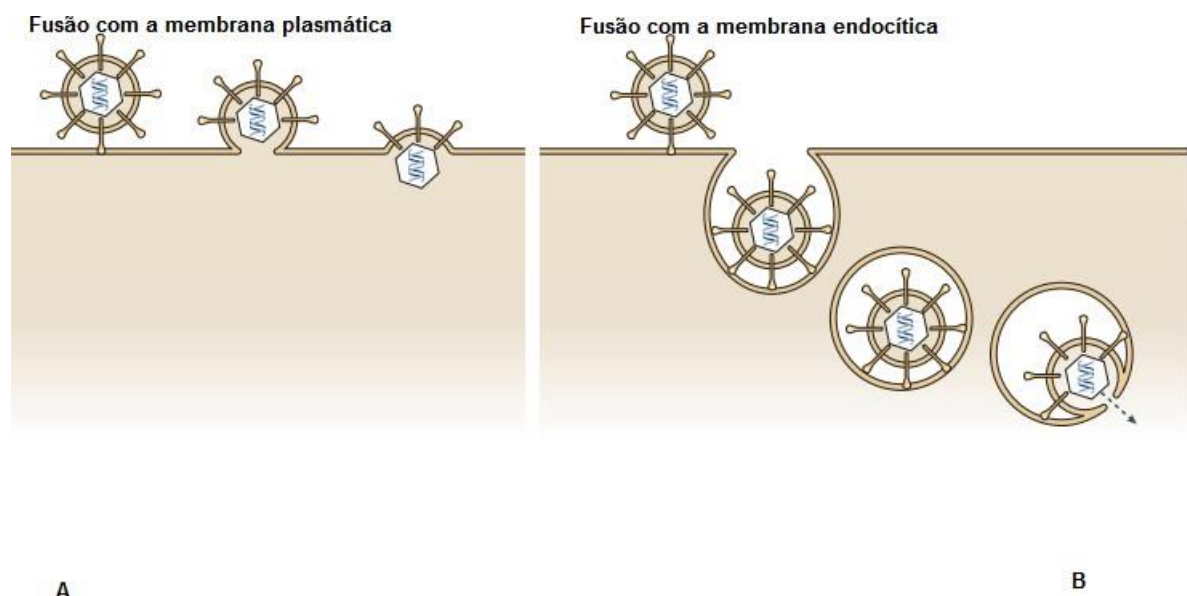
**Figura 1.1** – Estrutura morfológica e genômica dos betaherpesvírus. A) Os betaherpesvírus, assim como os demais herpesvírus, são icosaédricos, envelopados, com núcleocapsídeo contendo DNA dupla fita, tegumento, e um capsídeo viral. As glicoproteínas virais estão localizadas na superfície do envelope viral. B) As regiões codificadoras do genoma viral dos herpesvírus são denominadas de "região única longa" (UL) e "região única curta" (US), nas quais se referem ao comprimento do DNA entre as sequências repetidas terminais ou internas do DNA, conhecidas como regiões TR e IR. Fonte: (Close, Anderson e Pellet, 2018; Louten, 2016) (Modificado).

### 1.3 Processo de replicação viral dos herpesvírus

Os mecanismos envolvidos na interação entre a superfície celular e as glicoproteínas virais, assim como o processo de penetração e fusão viral têm sido estudados (Roizman & Campadelli-Fiume, 2007). É observado que os betaherpesvírus possuem diferentes características de entrada na célula hospedeira, o HCMV, por exemplo, realiza a entrada a partir de fusão direta com a superfície celular, tendo atividade de endocitose com outros tipos celulares (Roizman & Campadelli-Fiume, 2007). Já os HHV-6A, HHV-6B e o HHV-7 possuem características de entrada direta por via endocítica (Roizman & Campadelli-Fiume, 2007).

De forma geral, o processo de entrada dos betaherpesvírus, assim como os demais herpesvírus, nas células hospedeiras envolvem uma sucessão de etapas de interação entre as glicoproteínas do envelope viral, como gG1, gG2, g120 e gp 41, e moléculas da membrana da célula hospedeira, caracterizando o processo de adsorção (Krummenacher *et al.*, 2013; Close, Anderson & Pellet, 2018). Os betaherpesvírus dispõem de um número distinto de glicoproteínas virais, e a interação destas glicoproteínas é iniciada a partir do sulfato de heparano proteoglicano da superfície celular (HSPG) (Roizman & Campadelli-Fiume, 2007).

Além da entrada via interação das glicoproteínas e o HSPG, os betaherpesvírus também pode ocorrer via endocitose (Louten, 2016; Close, Anderson & Pellet, 2018). Esse processo pode ser realizado de duas maneiras: a partir de fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira ou através da fusão do envelope viral com a membrana endocítica da célula após o processo de endocitose da partícula viral (Figura 1.2) (Connolly *et al.*, 2011). A proteína gB presente no envelope viral do HCMV, HHV-6A, HHV-6B e HHV-7 se liga ao HSPG da superfície celular, o contato inicial é seguido por interações com vários receptores celulares (Roizman & Campadelli-Fiume, 2007).



**Figura 1.2** - Vias de entrada dos herpesvírus. Desenho esquemático apresentando as diferentes vias de entrada dos herpesvírus na célula hospedeira: fusão com a membrana plasmática (A) e fusão com a membrana endocítica (B). Fonte: Connolly *et al.*, 2011 (Modificado).

A ligação da proteína gB parece ser suficiente para a indução de algumas vias de sinalização celular (Roizman & Campadelli-Fiume, 2007). A proteína gB presente no HCMV é capaz de ativar o receptor EGF assim como as integrinas, como

mediadores de entrada (Roizman & Campadelli-Fiume, 2007). Essa cascata de sinalização pode desempenhar um papel crítico no condicionamento da célula hospedeira para a replicação viral após o processo de adsorção viral (Roizman & Campadelli-Fiume, 2007). Além do receptor EGF do HCMV, o HHV-6A e HHV-6B dependem do CD46, expresso em todas as células com exceção de eritrócitos, esse receptor celular é crítico e interage com complexos de glicoproteína gH (Roizman & Campadelli-Fiume, 2007). Já no HHV-7, o processo de entrada do vírus em células T depende do CD4 (Roizman & Campadelli-Fiume, 2007).

As proteínas do nucleocapsídeo viral e do tegumento são liberadas no citoplasma assim que ocorre a adsorção (Louten, 2016). Uma vez no núcleo, o capsídeo viral se liga aos filamentos citoplasmáticos que se estendem dos poros nucleares, esse processo desestabiliza o capsídeo viral e ocorre a descamação à medida que o DNA viral é transportado para o núcleo através do poro, auxiliado por proteínas do tegumento viral (Louten, 2016).

Algumas proteínas que faziam parte do tegumento também entram no citoplasma e auxiliam o processo de transcrição viral (Louten, 2016). Quando o DNA viral se encontra no núcleo da célula hospedeira, ele se circulariza (epissoma) (Louten, 2016). Após este processo, tem início a replicação viral no núcleo, ocorre a expressão de genes iniciais que irão codificar proteínas relacionadas à regulação gênica das próximas etapas de transcrição (Lopes, 2016).

As expressões dos genes precoces irão codificar proteínas relacionadas à replicação do genoma viral (Lopes, 2016). Por último, ocorre a expressão dos genes tardios, que irão codificar as proteínas estruturais dos herpesvírus, como as proteínas que formam o capsídeo viral, o tegumento e o envelope viral, nesta última estrutura ocorre a formação das glicoproteínas virais (Paludan *et al.*, 2011; Lopes, 2016).

Alguns genes conservados por betaherpesvírus codificam proteínas regulatórias que são importantes para o favorecimento de todas as etapas de replicação viral (Roizman & Campadelli-Fiume, 2007). O gene UL69 do HCMV, por exemplo, codifica um produto de gene tardio presente no tegumento do vírus, no qual regula a progressão do ciclo celular da célula hospedeira e a capacidade de deslocamento do vírus entre o núcleo e o citoplasma (Roizman & Campadelli-Fiume, 2007).

Após o núcleo celular atingir uma certa quantidade de proteínas tardias, ocorre a formação do capsídeo viral e o empacotamento do DNA viral é agregado nos capsídeos virais vazios, ocorrendo a formação dos nucleocapsídeos (Paludan *et al.*,



2011; Lopes, 2016). Após a formação dos nucleocapsídeos, estes são liberados por um processo denominado de brotamento através da membrana nuclear da célula hospedeira, então liberados no citoplasma celular (Lopes, 2016). Em betaherpesvírus, os capsídeos sem DNA viral amadurecem, aparecem no citoplasma celular e se acumulam como partículas envelopadas não infecciosas (Roizman & Campadelli-Fiume, 2007).

Quando os nucleocapsídeos são encontrados no citoplasma, estes são revestidos por uma camada de proteínas que irão formar o tegumento, e após isso, serão envelopados por membranas do complexo de Golgi, produzindo partículas virais infecciosas, com glicoproteínas virais específicas na superfície dos envelopes virais (Lopes, 2016). As vesículas citoplasmáticas irão transportar as partículas virais até a superfície celular, ocorrerá a fusão com a membrana celular e sendo liberados para o meio exterior (Lopes, 2016).

#### **1.4 Mecanismo de latência e reativação dos betaherpesvírus**

O sucesso de longa persistência viral dos betaherpesvírus, assim como de todos os herpesvírus está na habilidade de estabelecer latência e reativação em seus hospedeiros (Cohen, 2020). A latência causada pelos betaherpesvírus e herpesvírus em geral está relacionada a estabelecer infecção persistente em células sem causar lise celular pelo sistema imune do hospedeiro (Cohen, 2020). O DNA viral, desta forma, é mantido no núcleo da célula em múltiplas cópias de epissomas circulares (Cohen, 2020).

Durante a fase lítica dos herpesvírus, a célula hospedeira praticamente se converte em uma “fábrica de vírus”, na qual todos os seus processos celulares estão dedicados à produção de proteínas virais e a síntese do material genético do vírus (Weidner-Glunde, Kruminis-Kaszkiel e Savanagouder, 2020). Em contraste, durante a latência viral, não ocorre produção de partículas virais e a expressão de genes virais são reduzidas ao mínimo (Weidner-Glunde, Kruminis-Kaszkiel e Savanagouder, 2020). As subfamílias *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae* possuem vírus que desenvolveram estratégias de manter seus genes latentes em células em divisão, como por exemplo, progenitores hematopoéticos ou células linfóides, respectivamente (Tabela 2) (Weidner-Glunde, Kruminis-Kaszkiel e Savanagouder, 2020).

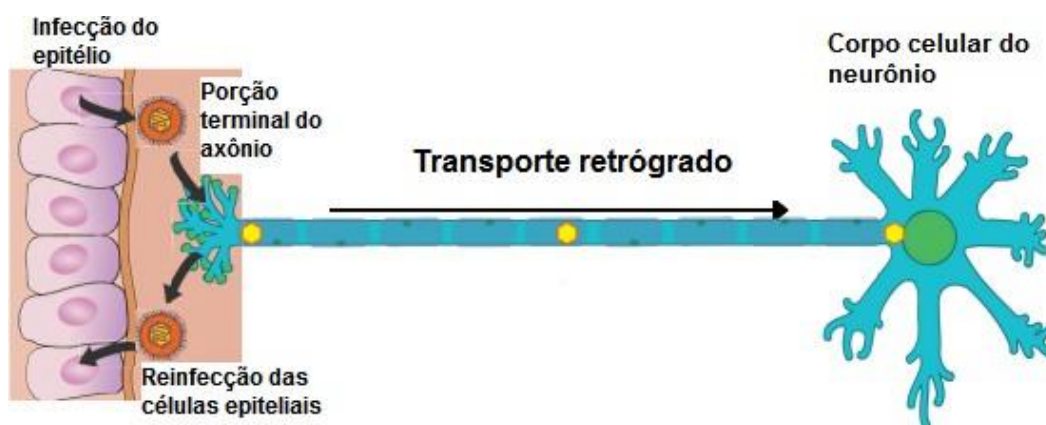
**Tabela 2** – Células hospedeiras dos betaherpesvírus e locais de latência.

Vírus	Célula alvo	Local de latência
<i>Betaherpesvírus humano 5</i> (Citomegalovírus)	Células epiteliais, monócitos e linfócitos	Monócitos e Linfócitos
<i>Betaherpesvírus humano 6A e 6B</i> (Vírus roséola)	Linfócitos T	Leucócitos
<i>Gammaherpesvírus humano 7</i> (Vírus roséola)	Linfócitos T	Linfócitos T e células epiteliais

Fonte: Evans, 2013 (Modificado).

As etapas de estabelecimento de latência celular e reativação viral são comuns em todos os *Herpesvírus humano* e suas subfamílias, tendo como diferente, aos demais herpesvírus, suas células hospedeiras. Assim, utilizaremos como exemplo do processo de latência e reativação viral o *Alphaherpesvírus humano 1* (HHV-1). Serão citadas mais adiante as particularidades de cada betaherpesvírus.

Para o estabelecimento da latência celular, após a ocorrência da infecção primária e da infecção ativa, que geralmente acontece em células epiteliais do hospedeiro, o vírus consegue infectar as terminações nervosas destes tecidos (Knipe e Cliffe, 2008; Lopes, 2016). Após a infecção das células nervosas (neurônios), o vírus é transportado através do fluxo axonal retrógrado e, a partir deste processo, ocorrerá a latência viral nestas células (Figura 1.3) (Knipe e Cliffe, 2008; Lopes, 2016).



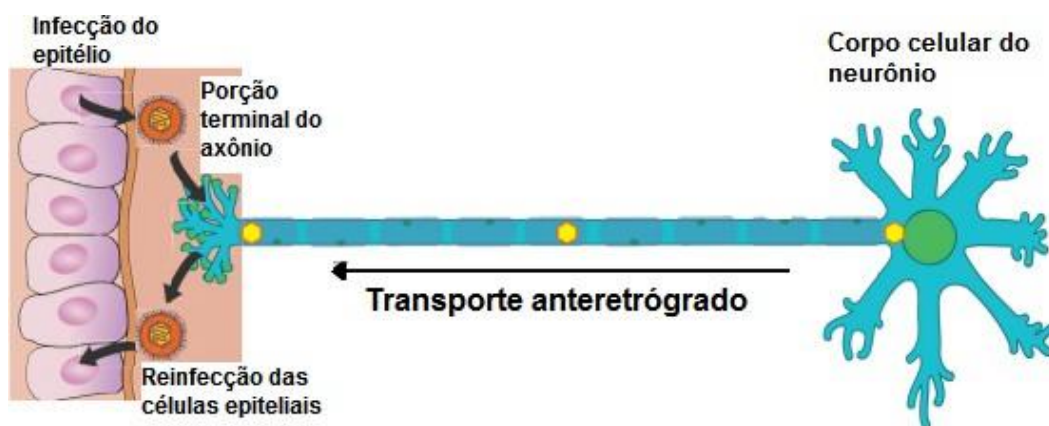
**Figura 1.3** - Latência celular. A infecção primária ocorre nas células epiteliais, após o processo de replicação viral, que leva a produção de novas partículas virais. Estes vírus também são capazes de infectar células nervosas, uma vez dentro destas células, o nucleocapsídeo é transportado através dos axônios até o corpo do neurônio através do transporte retrógrado e desta forma iniciando a latência celular. Fonte: (Louten, 2016) (Modificado).

O HCMV possui os fibroblastos e as células epiteliais como local de replicação viral, estabelecendo latência celular, primeiramente, em células mieloides progenitoras CD34+ e monócitos CD14+ (Cohen, 2020). A persistência viral e eliminação das partículas virais é realizada nas células epiteliais de glândulas salivares (Cohen, 2020). Já o HHV-6 infecta células T CD4+, assim como linfócitos B, T, células *Natural Killer*, monócitos e células nervosas, tendo o estabelecimento de infecção latente em células CD34+ e monócitos com infecção persistente em glândulas salivares (Cohen, 2020). Além disso, o HHV-7 infecta as células T CD4+ e estabelece infecção latente, o vírus também é capaz de infectar células epiteliais de pulmões e glândulas salivares (Cohen, 2020).

Enquanto o HCMV, o HHV-6A, HHV-6B e HHV-7 possuem o DNA viral em forma episomal no núcleo de células latentes, cerca de 1% a 2% de indivíduos saudáveis possuem o genoma do HHV-6 integrado em seus cromossomos, mais especificamente na junção subtelômero/telômero, e desta forma, o vírus torna-se capaz de ser transmitido através de células germinativas (Cohen, 2020; Kumata, Ito e Sato, 2020).

Muitos herpesvírus, incluindo os betaherpesvírus, são reativados durante períodos de baixa imunidade que se dá mediante períodos de extremo estresse como choques sépticos (Cohen, 2020). A reativação viral também ocorre mediante de supressão imunológica com a perda de atividade de células T (Cohen, 2020). Além disso, ocorre também a partir de radiação UV, estresse, febre e traumas em nervos (Cohen, 2020). O HCMV pode ser reativado a partir de estímulos causados por estimulação de células halogênicas, que explica parcialmente a forte associação de reativação do HCMV através de transplante, especialmente com enxertos realizados de indivíduos infectados (Cohen, 2020).

Na reativação viral, após a expressão dos genes líticos, novas partículas virais são sintetizadas, estas retornam pelo axônio através do fluxo axonal anteretrógrado, produzindo assim um novo ciclo de infecção a partir do ciclo de infecção inicial, resultando o aparecimento da doença e a transmissão do vírus para novos hospedeiros (Figura 1.4) (Knipe e Cliffe, 2008; Lopes, 2016).



**Figura 1.4** - Reativação viral. Após a reativação viral, inicia-se a expressão dos genes líticos, as partículas virais produzidas são conduzidas através de transporte anteretrógrado, saindo dos neurônios até as células epiteliais ou próximos deste sítio de infecção, onde ocorre novamente a infecção ativa, podendo resultar em infecções recorrentes e disseminação do vírus a novos hospedeiros. Fonte: Louten, 2016. (Modificado).

## **1.5 Características e manifestações clínicas dos *Betaherpesvírus humano***

### **1.5.1 *Betaherpesvírus humano 5* ou *Citomegalovírus humano (HCMV)***

O *Citomegalovírus Humano* (HCMV) é um vírus pertencente à subfamília *Betaherpesvirinae*, que infecta cerca de 50-90% da população, independentemente da idade, classe socioeconômica e país, sendo prevalente no mundo inteiro assim como os demais vírus da família *Herpesviridae* (Cannon *et al.*, 2010; Forte *et al.*, 2020).

A transmissão do HCMV ocorre a partir de contato com fluídos corporais de indivíduos infectados, incluindo sangue, leite materno, saliva, urina e secreções genitais (Clark *et al.*, 2013; Louten, 2016; Forte *et al.*, 2020). Células epiteliais de região de mucosa e de glândulas salivares são permissivas para a infecção viral e atuam como porta de entrada e saída do vírus (Forte *et al.*, 2020). É observado também que a transfusão sanguínea atua como via de transmissão do vírus para indivíduos soronegativos (Griffiths, Baraniak e Reeves, 2015; Lopes, 2016).

Após entrar no organismo do indivíduo, o HCMV inicia a infecção primária em células epiteliais da região da mucosa, tendo replicação em leucócitos imaturos e monócitos (Louten, 2016). A infecção por HCMV pode durar meses nestas células, sendo capazes de transportar o vírus para outros órgãos, como glândulas salivares, rins ou glândulas mamárias (Louten, 2016). Dessa forma, o HCMV estabelece infecção sistêmica no indivíduo, infectando vários tipos celulares e afetando todos os

principais órgãos afetados, como pulmão, retina, fígado, glândulas salivares, sistema digestório e sistema nervoso (Grefte *et al.*, 1994; Forte *et al.*, 2020). Em contraste aos demais tipos celulares envolvidos na infecção por HCMV, os leucócitos e monócitos polimorfonucleares não são capazes de suportar a replicação lítica, ocorrendo a lise celular, produzindo assim partículas virais e expressão de genes imediatos iniciais (IE), importantes para a replicação viral (Grefte *et al.*, 1994; Forte *et al.*, 2020).

Além dos tipos celulares citados anteriormente, o HCMV é capaz de infectar células da medula óssea, como as células progenitoras hematopoiéticas, nas quais estabelece latência (Forte *et al.*, 2020). Embora essas células sejam as progenitoras de linhagens de células linfóides e mielóides, o vírus em estágio latente é detectado apenas em monócitos no sangue (Torres & Tang, 2014; Forte *et al.*, 2020).

A infecção primária em indivíduos imunocompetentes é subclínica na maioria dos casos, sendo controlada pelo próprio sistema imune do indivíduo, resultando na lise de células infectadas e produção de partículas virais (Forte *et al.*, 2020). Porém, em algumas células, como monócitos, linfócitos e células epiteliais de glândulas salivares, a expressão do gene viral é silenciado, e o material genético do vírus, em forma de epissoma, é mantido no núcleo celular em estado quiescente denominado de latência celular (Clark *et al.*, 2003; Melnick *et al.*, 2012; Griffiths, Baraniak e Reeves, 2015; Lopes, 2016; Martí-Carreras & Maes, 2019; Forte *et al.*, 2020).

Em condições apropriadas, o vírus latente retorna à sua atividade replicativa, produzindo partículas virais infectantes (Forte *et al.*, 2020). A reativação viral, geralmente, não é associada em doença propriamente dita em indivíduos imunocompetentes, sendo assintomáticos na maioria dos casos, porém, em condições de imunocomprometimento resulta em desordens linfoproliferativas pós transplante, aumento da chance de infecção por outros patógenos, sepse e alta mortalidade (Forte *et al.*, 2020).

A transmissão por via sexual do HCMV é considerada rara, portanto, têm sido detectado o vírus em amostras de sêmen, fortalecendo a possibilidade de transmissão do HCMV através desta via (Griffiths, Baraniak e Reeves, 2015; Lopes, 2016). A transmissão vertical pode ocorrer durante a gestação por via transplacentária ou durante o parto normal, após o feto ter contato direto com secreções vaginais (Griffiths, Baraniak e Reeves, 2015; Lopes, 2016).

Cerca de 32% das gestantes infectadas por HCMV transmitem o vírus por via transplacentária, produzindo infecção intra-uterina (Kenneson & Canoon, 2007; Griffiths, Baraniak e Reeves, 2015; Lopes, 2016). Portanto, a infecção pelo vírus só

consegue ser diagnosticada durante o momento do parto, visto que os sintomas da gestante não são suficientes para a procura de assistência médica (Revello *et al.*, 2011; Griffiths, Baraniak e Reeves, 2015).

Durante anos, o HCMV tem sido estudado como um patógeno associado à algumas malignidades humanas por diversos grupos de pesquisa (Nauclér, Geisler e Vetvik, 2019). Muitos grupos têm detectado alta prevalência do HCMV em indivíduos com câncer de mama, câncer de próstata, rhadomiosarcoma, câncer hepatocelular, tumores em glândula salivar, neuroblastoma e alguns cânceres de cérebro (Samanta *et al.*, 2003; Harkins *et al.*, 2010; Lepiller *et al.*, 2011; Dziurzynski *et al.*, 2012; Price, 2012; Taher *et al.*, 2014; Náucleer, Geisler e Vetvik, 2019).

### **1.5.2 Betaherpesvirus humano 6A e 6B (HHV-6A/B)**

O *Betaherpesvirus humano 6* (HHV-6) foi isolado pela primeira vez de linfócitos provenientes de sangue periférico de um indivíduo adulto que apresentava doenças linfoproliferativas e era portador do *Vírus da Imunodeficiência Humana* (HIV), sendo então nomeado de *vírus B-linfotrópico humano* (HBVL) (Ablashi *et al.*, 1988; Caserta, 2018). Logo após esse evento, outros isolamentos do vírus foram realizados, sendo então identificado em linfócitos CD4+ e, após caracterizações do patógeno, foi constatado que se tratava de um herpesvírus (Caserta, 2018). Como era o sexto membro da família *Herpesviridae*, ele foi então nomeado de *Herpesvírus humano 6* (Figura 1.6A) (Caserta, 2018).

Após dois anos decorridos do primeiro isolamento do HHV-6, o vírus foi identificado em linfócitos de quatro crianças diagnosticadas com roséola, sendo então estabelecido que o HHV-6 é a causa principal de *Roseola infantum* em crianças, posteriormente sendo conhecido como a “sexta doença exantemática em crianças” (Yamanishi *et al.*, 1988; Caserta, 2018).

O HHV-6A e o HHV-6B estão descritos dentro do gênero *Roseolovirus* da subfamília *Betaherpesvirinae*, ambos os vírus se replicam em linfócitos T, entretanto existem diferenças relacionadas ao receptor utilizado por eles (Pantry & Medveczky, 2017; Caserta, 2018). É visto que o receptor primário utilizado pelo HHV-6A é o CD46, presente em todas as células humanas nucleadas (Pantry & Medveczky, 2017). De forma controversa, a utilização do CD46 pelo HHV-6B depende muito da cepa do vírus, assim como o fenótipo da linha celular a ser infectada (Pantry & Medveczky, 2017). Alguns estudos indicam que o receptor primário do HHV-6B é o CD134,

presente em células T ativadas, que fazem parte da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF) (Tang *et al.*, 2013; Pantry & Medveczky, 2017).

Além da diferença entre o HHV-6A e o HHV-6B em relação aos receptores celulares, os dois vírus diferem em reatividade de anticorpos, reatividade de clones de células T e padrões de bandas de restrição (Pantry & Medveczky, 2017). Dessa forma, o ICTV em 2014 reconheceu os dois vírus como vírus distintos, com diferentes dados epidemiológicos, assim como propriedades biológicas e imunológicas distintas, e doenças associadas a cada uma das variantes (Pantry & Medveczky, 2017; Caserta, 2018).

O modo de transmissão do HHV-6 em crianças ocorre a partir do contato de secreções nasais e saliva contendo o vírus, sendo mais comum de ser adquirido a partir de 1 ano de idade, devido ao comportamento característico de compartilhar brinquedos com saliva e secreções com outras crianças (Caserta, 2018). Além disso, como relatado anteriormente, o HHV-6 pode se integrar ao cromossomo do indivíduo (ciHHV-6), podendo estabelecer latência na medula óssea de indivíduos após transplante advindo de um doador com ciHHV-6 (Caserta, 2018; Kumata, Ito & Sato, 2020).

Infecções congênitas causadas pelo HHV-6 foram determinadas através da detecção do DNA viral em amostras de sangue provenientes de cordão umbilical (Dahl *et al.*, 1999; Hall *et al.*, 2004; Caserta, 2018). Infecções intrauterinas causadas pelo HHV-6 podem ser resultados a partir de partículas virais provenientes da mãe, passadas de forma transplacentária ou através de ciHHV-6 proveniente de células germinativas (Caserta, 2018; Kumata, Ito & Sato, 2020).

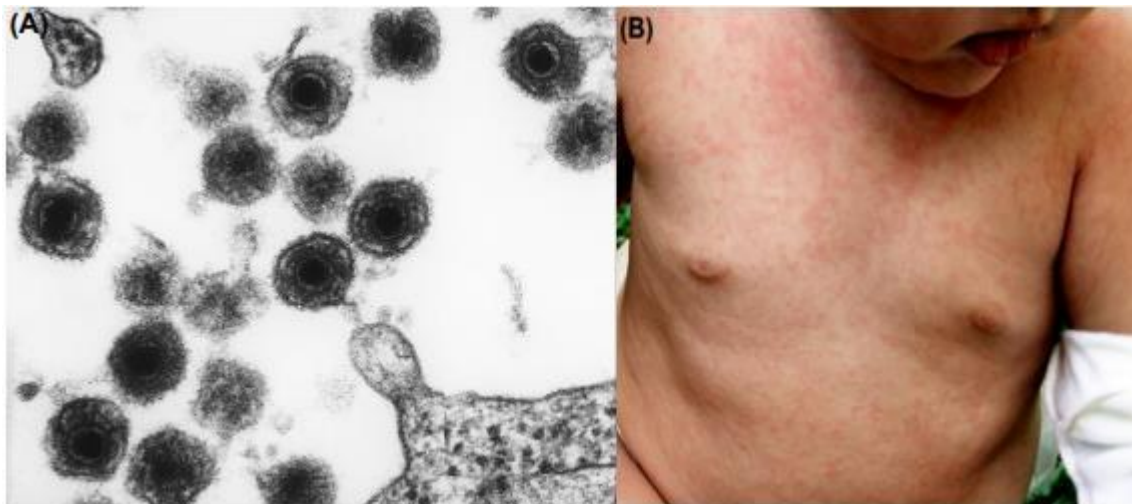
Após a infecção primária o HHV-6A e HHV-6B estabelecem latência viral em monócitos e macrófagos e, possivelmente em outros locais, como células hematopoiéticas (CD34+) e no sistema nervoso central (SNC) (Caserta, 2018). Além disso, é relatado que a infecção persistente ocorre em glândulas salivares (Ward *et al.*, 2006). A estrutura do genoma do HHV-6 durante a latência celular é mantida a partir de integração cromossômica e em forma de epissoma, assim como os outros herpesvírus, e apenas alguns genes virais são expressos durante este período (Caserta, 2018).

A reativação viral ocorre a partir de estímulos, podendo o indivíduo clinicamente se apresentar de forma assintomática ou resultar em doenças específicas em órgãos alvo (Caserta, 2018). Ocasionalmente, a infecção primária é intimamente associada

ao HHV-7, resultando na reativação do HHV-6, causando quadros de viremia e sintomas febris (Hall *et al.*, 2006).

O período de incubação do HHV-6 ocorre, em média, de 1 a 2 semanas, tendo a febre em crianças como sintoma mais comum entre os indivíduos (Cohen, 2014). Mais de 90% das crianças infectadas por HHV-6 possuem sintomas como, rinorreia (corrimento excessivo de muco nasal), febre e quando alta pode levar a convulsão, tosse, diarreia e *rash* cutâneo em cerca de 1/3 dos pacientes (Cohen, 2014).

O exantema súbito "*Roseola infantum* ou Sexta doença" é causada tanto pelo HHV-6B ou pelo HHV-7 (Cohen, 2014). A doença propriamente dita inicia com febre alta que, usualmente, persiste por cerca de 3 a 4 dias (Cohen, 2014). Após esse período, na chamada fase de "defervescência", o indivíduo desenvolve *rash* macular ou maculopapular, que se inicia da região do pescoço ao tronco, se espalhando pelas extremidades, podendo persistir por algumas horas ou por dois dias (Figura 1.6B) (Cohen, 2014; Caserta, 2018). Além disso, o exantema súbito pode ser acompanhado de quadros de tosse, linfadenopatia cervical e occipital, eritemas de membranas timpânicas, conjuntivite, edema palpebral, edema das moleiras, linfadenopatia, diarreias ou os chamados "locais de Nagayama" que são pápulas vermelhas no palato mole ou na base da úvula (Cohen, 2014). Em média, a duração dos sintomas é de 9 dias, tendo convulsões febris, meningites e encefalite como complicações raras (Cohen, 2014).



**Figura 1.6** – Partículas virais do HHV-6 e manifestações clínicas. A) Partículas virais do HHV-6 em microscopia eletrônica. B) Erupção maculopapular de *Roseola infantum* no peito de uma criança. Fonte: (Louten, 2016).



### 1.5.3 Betaherpesvirus humano 7 (HHV-7)

O *Betaherpesvirus humano 7* (HHV-7) foi descoberto em 1990 em isolados de linfócitos provenientes do sangue periférico de indivíduos saudáveis, sendo associado à causa de exantema súbito (Maldonado, 2011; Cohen, 2014). Assim como o HHV-6, o HHV-7 pertence ao gênero *Roseolovirus* enquadrado na subfamília *Betaherpesvirinae* (Maldonado, 2011).

O mecanismo principal de transmissão do vírus é a partir do contato com saliva de indivíduos infectados (Maldonado, 2011). Similar ao HHV-6, o HHV-7 causa infecção primária também em indivíduos durante a infância, podendo ocorrer de forma assintomática ou associada com quadros febris ou febre acompanhada de convulsão (Maldonado, 2011; Cohen, 2014). A segunda apresentação clínica mais comum da infecção causada por HHV-7 é febre inespecífica com temperatura mediana de 40.1°C e leucopenia (Cohen, 2014). Um dos sintomas menos comuns é acometimento do trato respiratório superior, vômitos e diarreia (Cohen, 2014). Em um estudo realizado em 496 crianças com infecção causada por HHV-7 demonstrou quadros clínicos de febre, rash cutâneo e sintomas gastrointestinais, sendo apresentados de forma mais tardia e com mais probabilidade de apresentar convulsões do que aqueles indivíduos com HHV-6 (Chan *et al.*, 2002; Cohen, 2014). Além disso, HHV-7 também têm sido associados à encefalite em indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos (Cohen, 2014).

O HHV-7 infecta linfócitos T CD4+, células epiteliais de glândulas salivares e células presentes nos pulmões e pele, estabelecendo latência em células T CD4+ (Cohen, 2014). Alta carga viral do HHV-7 é detectada em amostras de saliva na grande maioria dos indivíduos adultos e em crianças, além de ser também detectado em leite materno, sendo considerado como uma via de transmissão (Maldonado, 2011; Cohen, 2014).

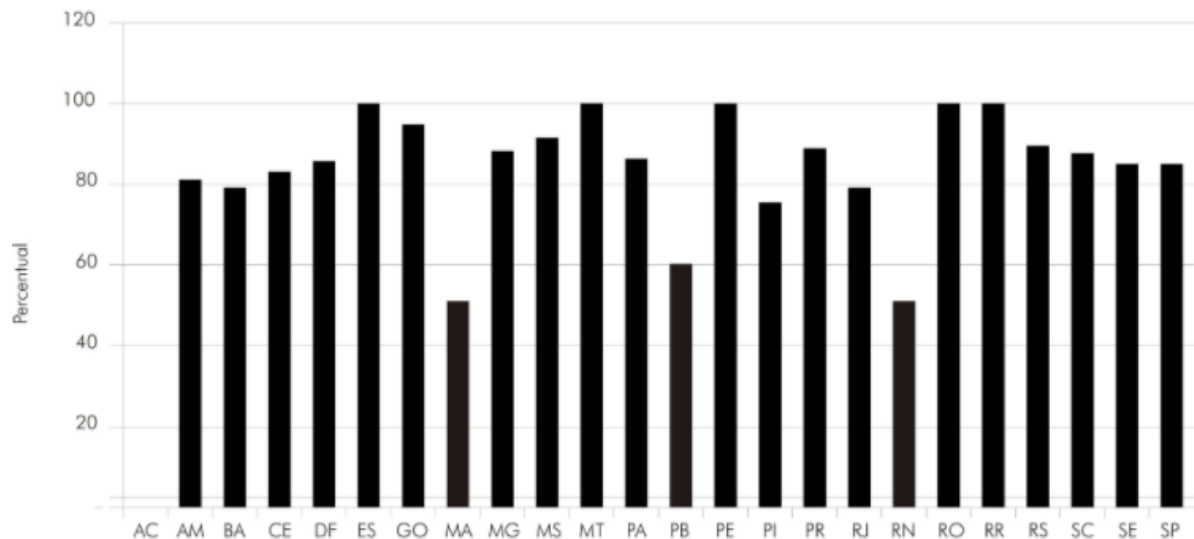
Anticorpos presentes no leite materno podem atuar como fator de proteção contra a infecção, entretanto, em um estudo realizado, indicou que o aleitamento materno confere em proteção temporária, não impedindo que o indivíduo adquira a infecção em algum momento de sua vida (Fujisaki *et al.*, 1998; Lanphear, Halll e Auinger, 1998; Maldonado, 2011). A transmissão perinatal do HHV-7, ou seja, a partir do momento do parto através de contato com secreções vaginais provenientes da mãe é desconhecida, e, além disso, infecções congênitas definidas como detecção de DNA viral no cordão umbilical também não foram reportadas em um estudo que investigou 5.600 nascimentos (Maldonado, 2011; Cohen, 2014).

## **1.6 Epidemiologia das infecções causadas por betaherpesvírus**

O HCMV possui alta prevalência no mundo inteiro, sendo de 50-90% da população positiva para o vírus, independente de classe socioeconômica (Cannon, Schmid e Hyde, 2010; Mana *et al.*, 2019). De acordo com o Centro de Controle de Doenças e Prevenção (CDC) e a Organização Mundial da Saúde (OMS), o HCMV pode infectar pessoas em todas as faixas etárias, 50% dos indivíduos adultos de 40 anos são infectados por HCMV e, aproximadamente uma de três crianças são infectadas por HCMV na idade de 5 anos nos Estados Unidos (Mana *et al.*, 2019; CDC, 2021).

O HCMV é a causa mais comum de infecção congênita no mundo inteiro, tendo como prevalência cerca de 0.2% e 2.2% em todos os recém nascidos (Marin *et al.*, 2016). A infecção pode ser de forma sintomática, porém a grande maioria dos casos, compreendendo entre 85% - 90% dos casos é de forma assintomática ao nascimento (Marin *et al.*, 2016). Aproximadamente 90% dos casos sintomáticos envolvem comprometimento neurológico e surdez neurossensorial unilateral ou bilateral, tendo chances de mortalidade (Marin *et al.*, 2016). Em relação aos recém-nascidos assintomáticos, alguns destes podem apresentar sintomas tardios e desenvolver sequelas progressivas e irreversíveis, incluindo comprometimento do sistema nervoso central, auditivo, de visão, retardo mental e no desenvolvimento psicomotor, entre outras complicações (Marin *et al.*, 2016).

Em relação à situação epidemiológica da infecção por HCMV no Brasil, a maioria dos estudos sobre prevalência no Brasil tem se concentrado em populações da Região Sudeste (Almeida *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2010; Lobato-Silva, 2016) (Figura 1.6). Apesar de existirem poucos dados soropidemiológicos sobre a situação de infecções por HCMV no Brasil, alguns trabalhos têm relatado que a idade média de infecção está compreendida entre 5 meses e 18 anos de idade, sendo as mulheres em idade fértil as mais vulneráveis a adquirirem a infecção primária (Almeida *et al.*, 2001; Lobato-Silva, 2016).



**Figura 1.6 – Figura 1.6 – Soroprevalência do HCMV em mulheres gestantes brasileiras durante o ano de 2009** Fonte: (Serra *et al.*, 2009).

Em relação às infecções associadas ao HHV-6A, HHV-6B e HHV-7, as prevalências se associam em cerca de 90% em indivíduos adultos, quanto ao HHV-6A e HHV-6B a soroprevalência encontra-se ao torno de 95% nesta mesma faixa etária (Candeias, Stewien & Barbosa, 1974; Freitas R.R, Freitas M.R & Linhares, 2003; Lisco *et al.*, 2007; Lopes, 2016). Anticorpos maternos para HHV-6 em recém-nascidos possuem declínio durante os primeiros 5 meses de vida do indivíduo (Cohen, 2014). Cerca de 40% - 50% das crianças são infectadas a partir de 1 ano de idade e 77% a 82% são infectadas a partir dos 2 anos de idade, com pico de infecção ocorrendo entre 9 a 21 meses (Cohen, 2014).

Já em relação a infecções causadas pelo HHV-7, é observado que estas ocorrem de forma mais tardia quando comparadas com infecções causadas por HHV-6 (Cohen, 2014). Cerca de 18% das crianças são infectadas por HHV-7 a partir de 1 ano de vida e 53% destes indivíduos, infectados a partir dos 2 anos de idade (Cohen, 2014). A grande maioria das crianças são infectadas entre os 2 e 5 anos de idade, presumindo-se que adquiram o vírus a partir de amostras de saliva provenientes de parentes ou irmãos infectados (Cohen, 2014). Além disso, cerca de 50% de transplante de células-tronco hematopoiéticas e 20% de receptores de transplantes de órgãos são capazes de reativar a replicação viral do HHV-7, indicando a presença de DNA viral no sangue periférico (Cohen, 2014).

## **1.7 Diagnóstico e tratamento das infecções causadas por betaherpesvírus**

O diagnóstico dos herpesvírus consiste na detecção de sintomas clínicos do paciente e de confirmações laboratoriais da infecção (Lopes, 2016). O diagnóstico das infecções causadas pelo HCMV, HHV-6 e HHV-7 é baseada na visualização dos sintomas clínicos do paciente, que pode indicar infecção primária ou quadro de reativação viral (Agut *et al.*, 2016). Os testes laboratoriais para a confirmação do diagnóstico dos betaherpesvírus são: cultura viral, imunofluorescência direta e ensaio imunoenzimático (ELISA), histopatologia realizada a partir de biópsia de tecidos e reação em cadeia de polimerase (PCR) (Razonable, 2019). A cultura viral, anteriormente, era considerada como padrão ouro para a detecção dos betaherpesvírus, porém atualmente esta prática é raramente utilizada, dando lugar ao PCR por ser mais prático e com alta sensibilidade e especificidade (Strick e Wald, 2006; Sen e Barton, 2007; Whitley & Baines, 2018; Raposo *et al.*, 2020).

O diagnóstico direto é responsável pela detecção dos betaherpesvírus além da caracterização destes, em especial a diferenciação entre o HHV-6A e HHV-6B (Agut *et al.*, 2016). Além disso, o diagnóstico direto se constitui na detecção direta do vírus e de componentes virais, tendo como alvo as partículas virais e os fluídos biológicos eliminados pelas células infectadas e tecidos (Agut *et al.*, 2016). Amostras de sangue total, plasma, saliva, aspirado de líquido cérebro espinhal, aspirado bronquialveolar e biópsias de tecidos tem sido alguns dos espécimes biológicos utilizados no diagnóstico direto (Agut *et al.*, 2016).

Técnicas de imunofluorescência e imunohistoquímica têm sido utilizadas, sendo principalmente utilizada em pesquisas biomédicas, porém estas técnicas possuem baixa sensibilidade e é limitada pelo número de anticorpos disponíveis na amostra (Agut *et al.*, 2016).

A técnica de PCR ao decorrer do tempo vem apresentando várias vantagens no diagnóstico das infecções virais, no caso do diagnóstico dos herpesvírus, a técnica consegue detectar pequenos fragmentos do genoma viral em pacientes assintomáticos, sendo indispensável a necessidade da presença de uma infecção ativa para isto (Lopes, 2016).

A técnica de PCR é capaz de amplificar uma região alvo do DNA viral por diversas vezes, utilizando nucleotídeos, sequências iniciadoras (primers) e enzimas polimerases (Lopes, 2016). E a partir disso, é possível obter inúmeras cópias de sequências específicas de ácido nucléico a partir de uma fita molde (Schmutzhard *et*

*al.*, 2004; Lopes, 2016). Atualmente, existem vários protocolos para a detecção dos herpesvírus (Raposo *et al.*, 2020). PCR *Pan*-betaherpesvirus (*Multiplex* qPCR) tem sido sugerido como uma alternativa eficiente para a detecção simultânea do HCMV, HHV-6 e HHV-7 em uma única reação (Raposo *et al.*, 2020).

O diagnóstico indireto constitui na detecção de anticorpos IgG e IgM, sendo mais utilizada a técnica de imunofluorescência (ELISA), além de técnicas de *Western-blot* e neutralização (Flamand *et al.*, 2014; Agut *et al.*, 2016). Vários fatores restringem estas técnicas, como reação cruzada de anticorpos entre o HCMV, HHV-6A, HHV-6B e HHV-7, ausência de testes sorológicos específicos para a diferenciação entre o HHV-6A e o HHV-6B, ausência de correlação entre valores absolutos e variações de titulação de anticorpos; e a presença de uma infecção viral ativa e a alteração de resposta imune humoral em alguns pacientes imunocomprometidos (Agut *et al.*, 2016). Na tabela 3 está descrita todas as técnicas utilizadas no diagnóstico dos betaherpesvírus, suas indicações e comentários.

**Tabela 3** – Técnicas de diagnóstico laboratorial utilizadas na detecção dos *Betaherpesvírus humano*.

Diagnóstico	Técnica	Indicações	Comentários
Diagnóstico indireto	Detecção e ensaios de avidéz por IgG e IgM por IF* e ELISA	Infecção primária e estudos de soroprevalência	Dificuldade de interpretação em caso de reativação viral e/ou imunodeficiência. Sem distinção entre HHV-6A e HHV-6B. Reação cruzada entre HCMV, HHV-6 e HHV-7.
Diagnóstico direto	Isolamento viral em cultura celular	Infecção ativa com produção viral	Método de referência, porém com alto custo, demanda de pessoas especializadas e alto consumo de tempo na realização.
	Detecção de antígenos	Infecção ativa com expressão de genes virais	Baixa sensibilidade e baixa sensibilidade. Viabilidade limitada de anticorpos de referência
	PCR qualitativo	Infecção com presença de genoma viral em tecidos e fluídos biológicos	Sem distinção entre infecção latente, infecção ativa e integração cromossômica.

PCR quantitativo	Infecção ativa com replicação viral e comparação da carga viral no sangue e em órgãos alvo	Técnica mais utilizada atualmente. Altamente sensível, específica, baixo custo e acessível.
Sequenciamento de DNA	Epidemiologia molecular, resistência antiviral e identificação de reinfeção ou coinfeções por diferentes cepas	Técnicas de NGS* precisam ser estudadas e padronizadas.

---

\*IF – Imunofluorescência. \*NGS – Sequenciamento de nova geração. Fonte: Agust *et al.*, 2016 (modificado).

In vitro, algumas drogas como o Foscarnet, Ganciclovir e Cidofovir têm inibido a replicação viral do HCMV, HHV-6 e HHV-7, atuando diretamente na inibição da atividade da DNA polimerase (Agut *et al.*, 2016). É importante destacar que estes medicamentos não possuem a capacidade de eliminar o vírus do organismo do indivíduo, somente atuam como paliativos durante a infecção ativa, previne sintomas e diminuem a probabilidade de transmissão e riscos (Lopes, 2016).

O Ganciclovir e o Cidofovir necessitam de terem dois ou três etapas de fosforilação, respectivamente, dentro das células infectadas para ativarem o efeito de inibição da DNA polimerase, enquanto o Foscarnet atua diretamente sem nenhuma necessidade de modificação celular (Agut *et al.*, 2016). Embora o Ganciclovir seja utilizado no tratamento contra as infecções causadas pelo HHV-6, o HHV-6A e o HHV-6B demonstram suscetibilidades diferentes à droga, sendo o HHV6-B suscetível ao Ganciclovir enquanto o HHV-6A é apresenta maior resistência a este antiviral (Lopes, 2016).

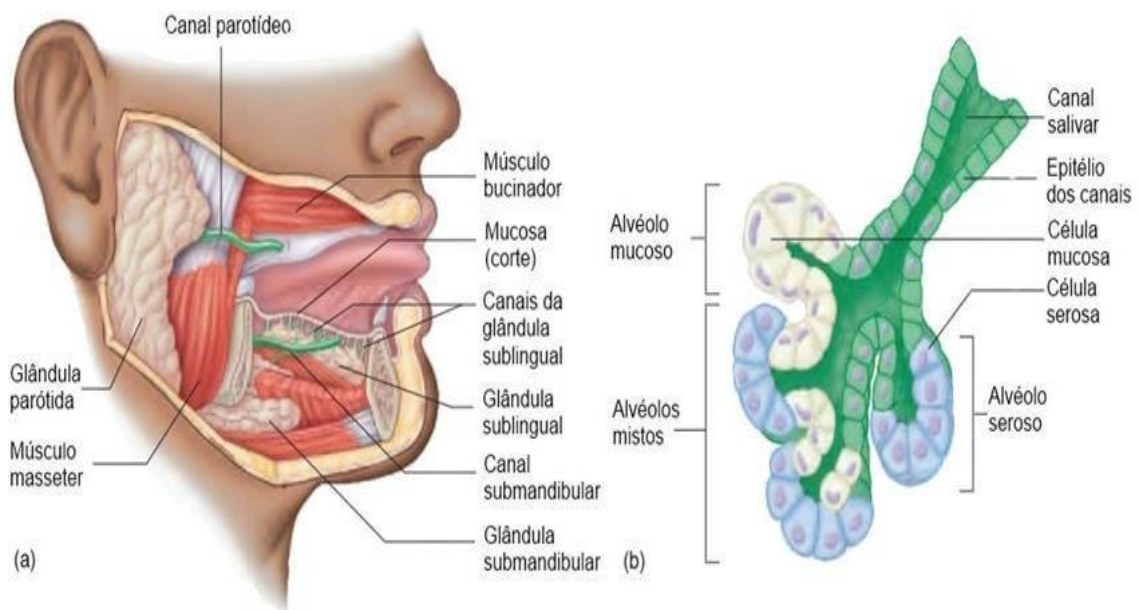
As etapas de fosforilação ocorrem através das quinases celulares, com exceção na primeira etapa do processo de fosforilação do Ganciclovir, no qual é catalizado pela fosfotransferase viral (ou proteína quinase) codificada pelo gene U69 (Agut *et al.*, 2016). Já o Foscarnet atua na inibição da DNA polimerase sem a necessidade da fosforilação da proteína quinase, sendo recomendado a pacientes que não respondem ao tratamento por outros antivirais (Brady & Bernstein, 2004; Lopes, 2016).

Nenhuma das terapias antivirais citadas anteriormente representam uma cura para a infecção latente dos *Herpesvirus humano* e dos *Betaherpesvírus humano*, pois

a atividade destes antivirais se resume na fase ativa do vírus, inibindo a atividade da polimerase viral por introdução, no interior da célula, de um composto fosforilado análogo a um nucleósido, que se liga ao DNA viral em replicação, impedindo com que ocorra as etapas seguintes do ciclo viral (Lopes, 2016).

### 1.8 Aspectos anatômicos de glândulas salivares

Anatomicamente, as glândulas salivares são divididas em maiores e menores, localizadas na região da cabeça e pescoço (Figura 1.7) (Holmberg e Hoffman, 2015; Kessler e Bhatt, 2018). As glândulas salivares maiores são agrupadas em três pares, sendo as glândulas parótidas, glândulas submandibulares e glândulas sublinguais (Holmberg e Hoffman, 2015). As glândulas salivares menores estão localizadas em toda a região da cavidade bucal, localizadas principalmente abaixo da língua (glândulas linguais), do palato (glândulas palatinas), região jugal (glândulas bucais) e lábios (glândulas labiais) (Sarmiento *et al.*, 2016).



**Figura 1.7** - Localização e esquematização das glândulas salivares. Na figura (a), está evidenciada a localização das principais glândulas salivares. Já na figura (b), está esquematizado a estrutura genérica de uma glândula salivar. Fonte: Sarmiento *et al.*, 2016 (Adaptado).

A estrutura anatômica das glândulas salivares consiste em glândulas alveolares ramificadas, com cavidades alveolares semelhantes a cachos de uva, um duto arborizado que se abre na cavidade oral com acessórios secretórios e a estrutura acinar, que atua na produção de saliva (Figura 1.7B) (Holmberg e Hoffman, 2014).

As células acinares estão envoltas de matrix extracelular, células miopiteliais, miofibroblastos, células do sistema imune, células endoteliais, células estromais e fibras nervosas (Holmberg e Hoffman, 2014). Já os dutos atuam na transportação e modificação da saliva antes da excreção na cavidade oral através do duto excretório (Holmberg e Hoffman, 2014; Sarmiento *et al.*, 2016).

As glândulas parótidas atuam na produção de saliva aquosa, sendo estas localizadas na porção anterior ao ouvido de cada lado da cabeça (Sarmiento *et al.*, 2016). Já as glândulas submandibulares são ambíguas, possuindo maior quantidade de alvéolos serosos do que mucosos, localizadas ao longo do limite inferior da metade posterior da mandíbula (Sarmiento *et al.*, 2016).

As glândulas sublinguais são as menores dentre todas, apesar de possuírem alvéolos serosos, estes tipos de glândulas salivares são formadas principalmente por alvéolos mucosos (Sarmiento *et al.*, 2016). Estas glândulas não possuem canais bem definidos ao contrário das demais glândulas salivares, estas se abrem no pavimento da cavidade bucal através de 10 a 20 pequenos canais menores (Sarmiento *et al.*, 2016).

A saliva é produzida pelas glândulas salivares, sendo uma combinação de secreções serosas diluídas e secreções mucosas e espessas, possuindo múltiplas funções, incluindo lubrificação da cavidade oral que permite o ato de fala, deglutição, alimentação, digestão, sabor, saúde dental e manutenção da homeostase oral (Holmberg e Hoffman, 2014; Sarmiento *et al.*, 2016). As glândulas salivares de um indivíduo adulto saudável produz aproximadamente 90% de saliva, sendo a secreção de saliva estimulada por nervos parasimpáticos e simpáticos do sistema autônomo (Holmberg e Hoffmnan, 2014).

O sistema de vascularização e inervação das glândulas salivares é bem rico (Holmberg e Hoffman, 2014). A glândula parótida recebe suprimento sanguíneo através da artéria temporal superficial (Holmberg e Hoffman, 2014). O nervo facial está intimamente associado à glândula parótida, uma lesão neste nervo resulta em paralisia hemifacial e atua como risco significativo de cirurgias para a remoção de tumores nesta glândula (Holmberg e Hoffman, 2014).

### **1.9 Histologia, apresentações clínicas e epidemiologia de tumores em glândulas salivares**

Tumores em glândulas salivares são considerados como um grupo de patologias que causam lesões com morfologias distintas com desafios no diagnóstico



e tratamento (Guzzo *et al.*, 2010; Sarmiento *et al.*, 2016). Ao todo, existem quase 40 tipos histológicos de tumores em glândulas salivares com alguns tipos bastante raros, sendo apenas retratados em alguns relatos de casos sendo os tipos mais comuns o adenoma pleomórfico, carcinoma mucoepidermóide, carcinoma adenoide cístico e adenocarcinomas (Seifert *et al.*, 1990; Speight e Barret, 2002; PDQ Cancer Information Summaries, 2002). De todas as neoplasias de glândulas salivares, mais de 50% dos tumores são classificados como benignos e aproximadamente 70% a 80% de todas as neoplasias de glândulas salivares se originam na glândula parótida (Speight e Barret, 2002; Gooden *et al.*, 2002; PDQ Cancer Information Summaries, 2002).

Devido à dificuldade de diferenciação entre tumores malignos e benignos, estes tipos de neoplasias em glândulas salivares são considerados como patologias que causam grandes desafios para os patologistas cirúrgicos (PDQ Cancer Information Summaries, 2002). A complexidade da classificação desses tipos de tumores e à raridade destas neoplasias pode apresentar um amplo aspecto de diversidade morfológica em lesões individuais (PDQ Cancer Information Summaries, 2002).

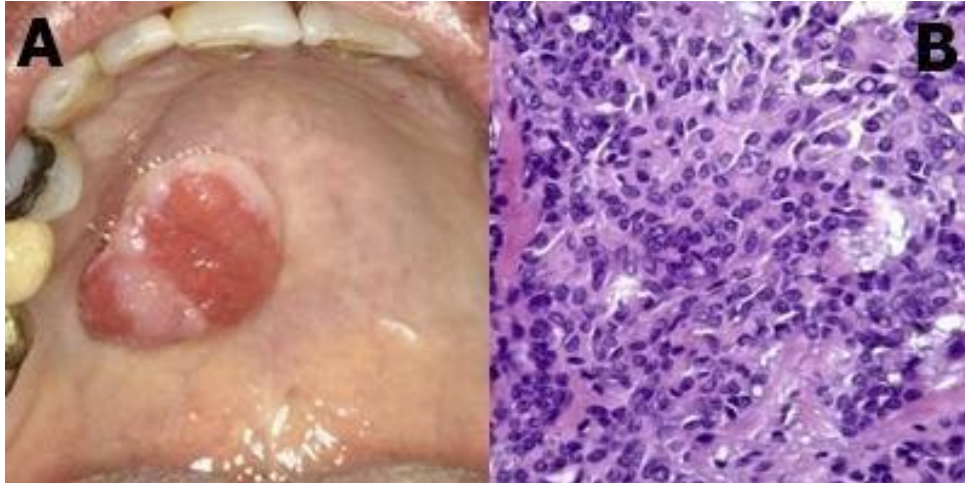
A maioria dos pacientes com tumor benigno em glândula salivar, sejam nas glândulas maiores e menores, apresenta inchaço indolor das glândulas parótidas, submandibulares ou sublinguais (PDQ Cancer Information Summaries, 2002). Sinais neurológicos, como dormência ou fraqueza, são indicativos de aparecimento de tumores malignos em glândulas salivares (PDQ Cancer Information Summaries, 2002).

Fraqueza do nervo facial associada a um tumor da parótida ou submandibular é um indicativo de malignidade (PDQ Cancer Information Summaries, 2002). Além disso, dor facial persistente é altamente sugestiva de tumores malignos, aproximadamente de 10% a 15% das neoplasias malignas da parótida (Spiro *et al.*, 1975; Gooden *et al.*, 2002).

Um do tipo de tumor em glândula salivar caracterizado como benigno mais comum que ocorre em glândulas salivares maiores e menores é o adenoma pleomórfico, compreendendo entre 50% de todos os tumores de glândula salivar e 65% dos tumores em glândulas parótidas (Speight e Barret, 2002). Já o tipo de tumor maligno em glândula salivar mais comum que ocorre em glândulas maiores e menores é o carcinoma mucoepidermóide, compreendendo entre 10% de todas as neoplasias em glândula salivar e aproximadamente 35% dos tumores malignos (Speight e Barret, 2002; Guzzo *et al.*, 2002).

### 1.9.1 Neoplasia benigna: adenoma pleomórfico

O tipo mais comum de tumor benigno em glândula salivar é o adenoma pleomórfico, constituindo cerca de 40% dos tumores neste órgão (Figura 1.8) (Peel e Seethala, 2007). O adenoma pleomórfico também é chamado de tumor benigno misto, podendo ocorrer no lobo mais profundo da glândula parótida, com extensão para o espaço parafaríngeo (Peel e Seethala, 2007).



**Figura 1.8** – Adenoma pleomórfico e sua forma histológica. Em A é observado o adenoma pleomórfico, recoberto por mucosa com algumas regiões mais avermelhadas que indicam ulceração. Em B, é observado as características histopatológicas do adenoma pleomórfico, mostrando células mioepitelioides com aspecto plasmocitoide. Fonte: Junqueira *et al.*, 2016 (Adaptado).

Esse tipo de neoplasia acomete as glândulas salivares maiores e menores, representando cerca de 53% a 77% dos tumores de parótida, 44% a 68% dos tumores da glândula submandibular e 33% a 43% dos tumores de glândula salivar menor (Cardoso *et al.*, 2014). Quando ocorre em glândulas salivares menores, ocorre preferencialmente em palato duro e lábio superior (Cardoso *et al.*, 2014).

O diagnóstico do adenoma pleomórfico consiste em realização do exame clínico e da investigação da história da doença (Cardoso *et al.*, 2014). Exames por imagem, como ressonância magnética e tomografia, são exames que fornecem informações que são capazes de auxiliar no diagnóstico de forma não evasiva do adenoma pleomórfico, além de fornecer informações anatômicas detalhadas (Cardoso *et al.*, 2014).

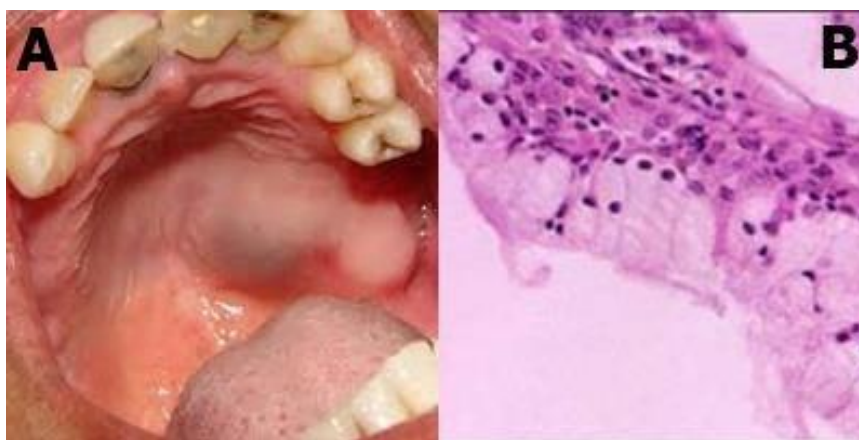
Em relação à manifestação clínica dos adenomas pleomórficos, este tipo de tumor usualmente se manifesta de forma assintomática com progressão lenta, com edema da glândula parótida sem envolvimento do nervo facial (Jain *et al.*, 2015). Quando sintomático, os pacientes com adenoma pleomórfico podem apresentar

paralisia facial, consistindo cerca de 33% dos pacientes apresentando esta manifestação clínica (PDQ Cancer Information Summaries, 2002).

O adenoma pleomórfico é considerado como uma das poucas neoplasias benignas que pode sofrer transformação da sua forma benigna para a forma maligna, tendo uma taxa de 4,5% de incidência (Martinelli *et al.*, 2002). É observado que a probabilidade de uma alteração maligna do adenoma pleomórfico aumenta de acordo com a duração do tumor e também com a idade do paciente (Martinelli *et al.*, 2002).

### 1.9.2 Neoplasia maligna: carcinoma mucoepidermóide

O carcinoma mucoepidermóide é considerado como um tumor epitelial maligno, no qual é composto por vários tipos morfológicos de células como células mucosas, epidermóides, intermediárias, colunares e claras, apresentando, com frequência, crescimento cístico proeminente (PDQ Cancer Information Summaries, 2002). Este tipo de tumor é dado como a neoplasia mais comum que é frequentemente observada nas glândulas salivares maiores e menores (Figura 1.9) (PDQ Cancer Information Summaries, 2002).



**Figura 1.9** - Carcinoma mucoepidermóide em palato duro e forma histológica. Em A, é observado a lesão na região do palato duro, apresentando coloração vermelho arroxeada. Em B, é observado os cortes microscópicos revelando presença de células claras, com núcleo hiper cromático deslocado para a porção basal da célula. No tecido conjuntivo, observa-se presença de infiltrado inflamatório crônico mononuclear, com infiltrado de linfócitos, plasmócitos e macrófagos em todo o tecido conjuntivo. Fonte: Zini *et al.*, 2010 (Adaptado).

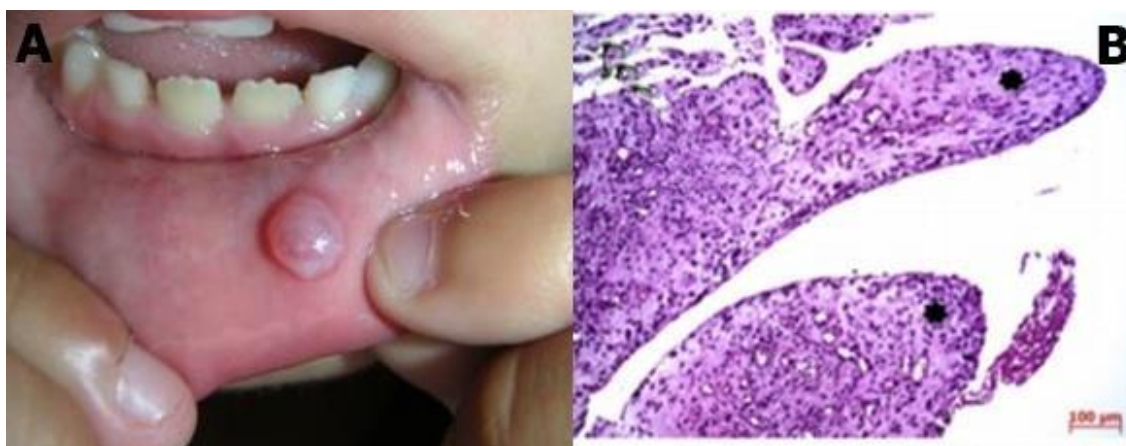
Em suma, o carcinoma mucoepidermóide é o tumor maligno mais comum em glândula salivar, compreendendo de 10% a 15% de todos os tumores em glândula salivar e de todas malignidades neste órgão, seguido por carcinoma cístico adenoide

(Pires *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2017; Peraza *et al.*, 2020). Antes de 1990, o carcinoma mucoepidermoide representava cerca de 27% dos tumores malignos salivares, entretanto, alguns estudos após o período de 1990 demonstraram que os carcinomas mucoepidermóides salivares representavam uma taxa de 45%, ou seja, praticamente o dobro (Adel *et al.*, 2017; Pires *et al.*, 2020).

Em termos de tratamento para carcinoma mucoepidermoide, o mais utilizado é a resseção cirúrgica que possui o objetivo de retirar o tumor e assim, minimizar a morbidade (Yih, Kratochvil e Stewart, 2005; Peraza *et al.*, 2020). O uso de radioterapia na fase pós operatória também é recomendada em casos de estágio tumoral avançado, também utilizado em casos de tumores de alto grau, invasão perineural ou linfovascular (Peraza *et al.*, 2020).

### 1.9.3 Lesão não neoplásica: mucocele

A lesões do tipo mucocele são lesões não neoplásicas císticas que ocorrem nas glândulas salivares menores (Figura 1.10) (Chi *et al.*, 2017). Este tipo de lesão é caracterizada em resultar alterações nas glândulas salivares devido ao acúmulo de muco causando edema neste órgão (Bagán Sebastián *et al.*, 1990; Senthilkumar e Mahabob, 2012).



**Figura 1.10** - Lesão do tipo mucocele e apresentação histológica. Em A, pode-se observar a lesão localizada no lábio inferior, sendo esta considerada como uma região comum em que é encontrada estes tipos de lesões. Já em B, observa-se os aspectos histológicos. É visto o tecido com granulosidades projetando polipóides no lúmen do tecido. Fonte: Conceição *et al.*, 2014 (Modificado).

Cerca de 60% a 70% das mucocelos vão ocorrer no lábio inferior, 6% a 15% ocorrem no assoalho da boca, e apenas alguns poucos casos de mucocele são relatados ocorrendo em glândula submandibular (Chi *et al.*, 2017). Alguns fatores

como trauma ou obstrução do ducto da glândula salivar atuam para o desenvolvimento de mucoceles (Chi *et al.*, 2017).

Existem dois tipos clínicos de mucocele que podem aparecer: extravasamento e retenção (Senthilkumar e Mahabob, 2012). O extravasamento de mucocele é resultante de uma ruptura do ducto de glândula salivar que, em consequência, resulta em derramamento no tecido mole ao redor da glândula (Senthilkumar e Mahabob, 2012). Já a mucocele de retenção aparece em decorrência da diminuição ou ausência da secreção glandular produzida pelo bloqueio dos ductos das glândulas salivares (Senthilkumar e Mahabob, 2012). A diferença histológica entre os aspectos de extravasamento e cisto de retenção é que o tipo extravasamento não possui revestimento epitelial, formado por uma formação de muco circundada por tecido de granulação (Senthilkumar e Mahabob, 2012).

As apresentações clínicas da mucocele se classificam em bolhas ou vesículas cheias de líquido, sendo flutuantes e de aspecto azulado ou translúcido, apresentando crescimento lento e em grande maioria de forma assintomática (Ferreira *et al.*, 2015). O diagnóstico diferencial é de suma importância, pois as mucoceles apresentam os mesmos aspectos clínicos com outras lesões, como hiperplasia fibrosa focal, papiloma e lipoma (Ferreira *et al.*, 2015).

O tratamento convencional é baseado em remoção cirúrgica da glândula salivar afetada, tendo como tratamentos alternativos a terapia com laser, criogenia e marsupialização (Ferreira *et al.*, 2015). Em suma, os prognósticos das mucoceles são excelentes, porém algumas lesões podem reaparecer, dependendo do tratamento escolhido (Ferreira *et al.*, 2015).

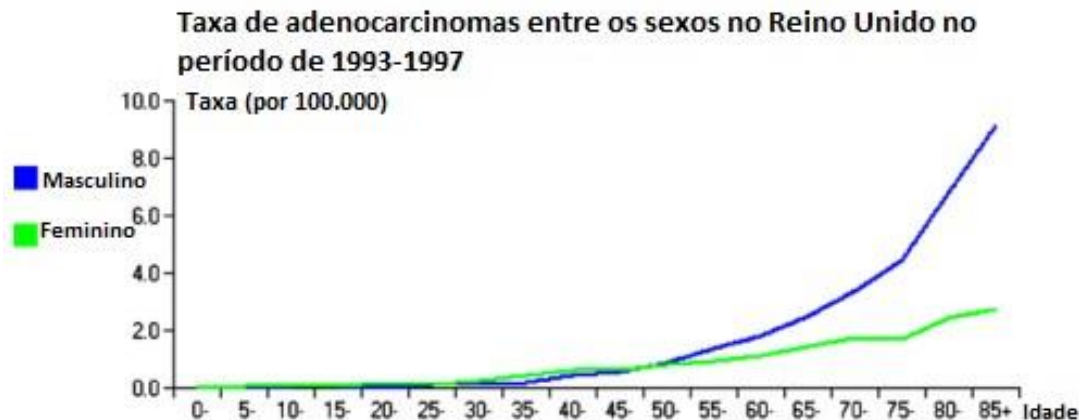
### **1.10 Aspectos epidemiológicos de neoplasias em glândulas salivares**

Tumores em glândulas salivares são considerados como casos raros em incomuns que são associados à quadros clínicos que acometem a região da cabeça e pescoço (To *et al.*, 2012). A grande maioria desses tumores são benignos e apenas 20% destes são considerados como tumores malignos (To *et al.*, 2012). Dados epidemiológicos sugerem que a incidência anual de tumores em glândulas salivares varia de 0,5 a 2 por 100.000 em homens de diferentes partes do mundo, sendo neste estudo a Croácia como o país que possui maior incidência desta patologia (Figura 1.11) (Guzzo *et al.*, 2010; To *et al.*, 2012).



**Figura 1.11** – Gráfico de incidência mundial de tumores em glândula salivar. É possível observar no gráfico, que a Croácia é o país que possui maior incidência de tumores em glândula salivar, seguido por Filipinas e Austrália. Fonte: Guzzo *et al.*, 2009 (Adaptado).

A taxa de distribuição de tumores em glândulas salivares nos gêneros femininos e masculinos são iguais, com a maioria dos casos ocorrendo na sexta década de vida do indivíduo (Licitra *et al.*, 2003; To *et al.*, 2012). A maioria dos tumores que ocorrem em glândulas salivares é principalmente os adenocarcinomas que acometem as glândulas parótidas (Guzzo *et al.*, 2010). Esses tumores são raros em idades inferiores a 40 anos, apresentando maiores incidências em idades mais avançadas, sendo que a partir dos 55 anos os indivíduos do sexo masculino mais acometidos por este tipo de tumor do que os indivíduos do sexo feminino (Figura 1.12) (Guzzo *et al.*, 2010).



**Figura 1.12** – Gráfico de adenocarcinomas entre os sexos no Reino Unido no período de 1993-1997. Observa-se no gráfico que indivíduos do sexo masculino e feminino raramente apresentam adenocarcinomas em idades inferiores a 40 anos. Acima de 40 anos, é observado um aumento das taxas de adenocarcinomas, tendo maior incidência deste tipo de tumor nos indivíduos do sexo masculino a partir dos 55 anos. Fonte: Guzzo *et al.*, 2010 (Adaptado).

Os fatores etiológicos sobre o desenvolvimento de tumores em glândula salivar ainda não são descritos com clareza (Guzzo *et al.*, 2009; To *et al.*, 2012). Entretanto, alguns fatores de risco como tabagismo e consumo de bebidas alcóolicas são consideradas como práticas importantes para o desenvolvimento de tumores em glândulas salivares (To *et al.*, 2012). Alguns estudos demonstram que dietas ricas em consumo de vitamina C e alimentos com baixo teor de colesterol atuam como fatores de prevenção do desenvolvimento desses tipos de tumores (To *et al.*, 2012).

Radiações também são consideradas como um fator de risco para o desenvolvimento de tumores malignos em glândulas salivares (Guzzo *et al.*, 2009). Como verificado japoneses sobreviventes da bomba atômica em Nagasaki e em pacientes que receberam radiação na região da cabeça e pescoço durante a infância para o tratamento de tumores benignos a fim de reduzir o tamanho das tonsilhas e adenoides (Sun *et al.*, 1999; Guzzo *et al.*, 2009).

### **1.11 Detecção de betaherpesvírus em glândulas salivares**

Existe uma miríade de vírus que podem infectar as glândulas salivares, causando diferentes desordens nestes órgãos, em geral, as infecções virais podem causar redução na produção de saliva e, conseqüentemente, redução da capacidade de salivação do indivíduo (Jeffers & Cyriaque, 2011).

Os *Betaherpesvirus humano*, como o HCMV, HHV-6 e HHV-7 são altamente disseminados na população mundial e têm sido associados com vários tipos de cânceres, sendo identificados em várias neoplasias de glândulas salivares (Shanehsazzadeh *et al.*, 2014; Chen A. A. *et al.*, 2017).

O HCMV, HHV-6 e HHV-7 possuem em seu genoma várias zonas oncogênicas que são capazes de causar estas neoplasias em glândulas salivares, alguns estudos necessitam ser realizados para compreender o papel destes vírus no desenvolvimento de neoplasias nestes órgãos (Waters *et al.*, 2019).

Alguns estudos têm sugerido que as glândulas salivares menores e maiores atuam como locais de latência e persistência viral do HCMV, HHV-6 e HHV-7, sendo eliminados pela saliva durante toda a vida do hospedeiro (Waters *et al.*, 2019; Raposo *et al.*, 2020). Além dos betaherpesvírus, outros vírus como a *Hepatite C* (HCV), *Papilomavirus humano* (HPV), vírus Epstein-barr (EBV), *Gammaherpesvirus humano 8* (HHV-8), *Coxsackievirus*, *Poliomavirus humano BK* (BKPyV), *Poliomavirus humano JC* (JCPyV), *vírus T-linfotrópico humano* (HTLV), HCMV associado a porquinhos da Índia, HCMV associado a camundongos (MCMV), *Poliomavirus* associado a camundongos (PyV), encefalomiocardite (EMC) e HIV são capazes de causar infecções em glândulas salivares e serem detectados em amostras de saliva de indivíduos infectados por estes vírus (Rahayuningtyas & Setiadhi, 2019).

Além de serem detectados em amostras de saliva, o HCMV, HHV-6 e HHV-7 tem sido detectados em amostras de tecidos parafinados de lesões em glândulas salivares, indicando que, possivelmente, estes vírus desenvolvem latência celular nestes órgãos, e que podem levar ao desenvolvimento de tumores devido a persistência viral (Sada *et al.*, 1996; Yen *et al.*, 2004).



## 2. Justificativa

A incidência anual global de neoplasias malignas de tumores em glândula salivar varia numa taxa de 0.9 a 2.6 casos por 100.000 indivíduos (Honjo *et al.*, 2018; Peraza *et al.*, 2020). Alguns estudos sugerem que as lesões salivares compreendem cerca de 3-4% de todos os tumores de cabeça e pescoço, possuindo variações na origem, histopatologia e em achados clínicos (Noel *et al.*, 2018).

Diversos estudos têm avaliado a frequência e a incidência de lesões salivares no Brasil e em outros países, porém os dados epidemiológicos em relação a estas lesões não são bem estabelecidos devido à grande variação na incidência e na prevalência destas patologias entre os países, indicando variação geográfica na frequência destas neoplasias (da Silva *et al.*, 2018; Vasconcelos *et al.*, 2016; Bello *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Vargas *et al.*, 2002).

Uma das possíveis causas etiológicas do desenvolvimento de lesões salivares, além de consumo de bebidas alcólicas, tabagismo e radioterapia, são as infecções virais (Lonn *et al.*, 2006; Teng *et al.*, 2014). É bem observado na literatura que os *Betaherpesvirus humano* como o HCMV, HHV-6 e HHV-7 possuem tropismo com células epiteliais de glândulas salivares, podendo estes órgãos, aturem como um sítio propício ao desenvolvimento de neoplasias devido à infecção latente (Sciubba, 2003; Lan & Luo, 2017) ou possam desempenhar um papel oncogênico devido a detecção destes vírus em pacientes com neoplasias em glândulas salivares, porém ainda apresentam dados inconclusivos (Chen A. A *et al.*, 2017).

Embora existam dados apresentados sobre possíveis agentes patogênicos que levam ao desenvolvimento destas neoplasias, ainda é observado escassez na vigilância de pacientes com estes tipos de patologias salivares, além da identificação do agente causador, implicando na dificuldade de estabelecimento de um tratamento adequado para estes indivíduos e, além disso, possíveis definições de causa etiológica para estas lesões salivares (Chen A. A *et al.*, 2017).

Dentro deste contexto, o presente estudo teve como objetivo a detecção da presença de DNA e carga viral de *Betaherpesvírus humano* (HCMV, HHV-6 e HHV-7) em amostras de glândula salivar, afim de verificar a possível relação com o tipo de lesões salivar desenvolvido.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.2 Objetivo Geral**

Investigar a presença dos Betaherpesvírus humano (HCMV, HHV-6 e HHV-7) em biopsias parafinadas de lesões em glândula salivar.

#### **3.3 Objetivos Específicos**

- Avaliar as características socioepidemiológicas dos pacientes em relação com os tipos de lesões em glândula salivar.
- Detectar os *Betaherpesvírus humano* em amostras parafinadas de lesões em glândula salivar por qPCR.
- Investigar a correlação da presença do *Betaherpesvírus humano* com os tipos de lesões em glândula salivar.
- Investigar a presença de coinfeções por *Betaherpesvírus humano* com os tipos de lesões glândula salivar.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Descrição da população de estudo**

Trata-se de um estudo retrospectivo de corte transversal que incluiu amostras oriundas de biópsias de lesões salivares, como: lesão neoplásica (adenoma pleomórfico (n=27), carcinoma mucoepidermoóide (n=6) e lesão não neoplásica mucocele (n=35) em glândula salivar. Como critério de inclusão, foram incluídas amostras que apresentavam inclusão do tecido adequadas, cortes histológicos precisos e material suficiente para todas as análises moleculares. Como critérios de exclusão, foram excluídas amostras que não se enquadravam nos critérios citados anteriormente.

Ao todo, 68 amostras de tecido incorporado em parafina foram analisadas e identificadas segundo critérios histológicos. As mucocelos foram definidas como lesões que apresentaram áreas com extravasamento de mucina cercadas por tecido de granulação de reação. Os critérios para o diagnóstico de adenoma pleomórfico, carcinoma mucoepidermoóide e mucocele se basearam em critérios histológicos propostos pela Organização Mundial da Saúde (OMS). As lesões escolhidas para análise baseavam-se na frequência de ocorrência. Como critérios de inclusão, foram utilizadas amostras com materiais histológicos que apresentassem qualidade suficiente da técnica de inclusão do tecido em parafina e cortes histológicos precisos. Como critérios de exclusão, foram excluídas amostras que não se enquadrassem nos critérios citados anteriormente.

Em relação às características dos pacientes foram analisadas informações sobre sexo, idade, cor de pele, quadro clínico e tamanho da lesão. Os prontuários e as amostras dos pacientes participantes do estudo foram provenientes do Laboratório de Patologia Cirúrgica Oral e Maxilofacial, Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (USP) (protocolo 3.683.851).

### **4.2 Extração de ácido nucleico**

O DNA viral foi extraído usando o kit comercial *MagMax FFPE DNA/RNA Ultra Kit* (*ThermoFischer Scientific*, Massachusetts, EUA) seguindo o protocolo de

fabricação. Esta técnica consiste em extrair a parafina do tecido a fim de obter DNA ou RNA da mesma seção do tecido.

Primeiramente, as amostras foram mantidas em tubos de poliestireno de 1.5 mL, e as pérolas de ligação de ácido nucleico (*acid binding beads*) foram equilibradas em temperatura ambiente e os termoblocos foram pré-aquecidos à temperaturas de 50 °C, 55 °C e 90 °C. Antes do início da extração de material genético viral, foi preparada a solução de trabalho (*working solution*) de acordo com o tamanho do corte trabalhado  $\leq 4 \mu\text{m}$ , que consiste em 10  $\mu\text{L}$  de protease e 100  $\mu\text{L}$  de tampão de digestão de protease (*protease digestion buffer*) e 270  $\mu\text{L}$  de tampão de ligação de DNA (*DNA binding buffer*). Essa solução era preparada em tubos de poliestireno de 1.5 mL a cada extração, pois não podia ser armazenada.

Como primeiro passo da extração foi necessário a extração da parafina do tecido. Para isso, foi adicionado 1mL de xilol (*Alphatec*, Macaé, Brasil) ao corte do tecido parafinado e realizado uma breve homogeneização no vórtex. Após a adição do solvente, a amostra foi brevemente centrifugada, com a configuração do botão *spin* da máquina, garantindo que todo o tecido estivesse submerso ao xilol e, posteriormente aquecida em termobloco por 3 minutos a 50 °C para derreter a parafina. Logo após o aquecimento, a amostra foi centrifugada, com a configuração do botão *spin* da máquina, com a intenção de depositar o tecido ao fundo tubo, sendo realizada a remoção e descarte do solvente.

Realizada a remoção do xilol da amostra, por ser tratar de cortes pequenos, tendo cerca de 4  $\mu\text{m}$ , foi realizada somente 1 lavagem com etanol 100% (*Merck*, Darmstadt, Alemanha). Foi adicionado 1mL de etanol na amostra e homogeneizada por um vórtex até o tecido se tornar opaco. Logo após, a amostra foi centrifugada à velocidade máxima de 16220 rpm por dois minutos e removido o máximo de etanol possível sem atingir o tecido.

O próximo passo consistiu em secar o tecido, para isso, os tubos foram abertos e deixados em temperatura ambiente por cerca de 45 minutos. Tendo as amostras secas foi adicionada 110  $\mu\text{L}$  de protease e, com o auxílio de uma ponteira de pipeta, foi empurrado para o fundo do tubo todo o tecido que se grudou nas laterais do tubo. Após a adição da protease, foram realizadas duas incubações em termobloco, sendo a primeira por 55 °C e a segunda por 90 °C por 1h cada. Após cada incubação, as amostras eram centrifugadas a fim de coletar gotículas de condensação provenientes do aquecimento.

Após deixar as amostras resfriarem depois da última incubação, o próximo passo consistiu em ligar o DNA às pérolas e coletar o sobrenadante contendo RNA. Para isso, foi adicionado 155 µL de tampão de ligação do DNA (*DNA binding buffer*). Após a adição do reagente, as amostras foram vortexadas por 5 minutos à velocidade de 8 rpm, ficando na coloração de chocolate. Terminado a homogeneização, as amostras foram colocadas em um suporte magnético por 2 minutos até a solução clarear e as pérolas, responsáveis pela cor de chocolate nas amostras, serem atraídas pelo ímã para o fundo do tubo. Após esse processo, foi removido todo o sobrenadante contendo RNA e depositado em um novo tubo de poliestireno de 0.5 mL e armazenadas no -70 °C para posteriores análises moleculares.

Para a extração de DNA foram realizadas lavagem das pérolas obtidas nas etapas anteriores. Foi adicionado 200 µL do reagente tampão de lavagem do DNA nas amostras e realizada o vórtex por 2 minutos por 1100 rpm até a mistura se apresentar totalmente na cor de chocolate. As amostras foram colocadas no suporte magnético por 2 minutos até a amostra clarear e os pérolas serem depositados ao fundo do tubo. O supernadante foi removido com uma pipeta e foram repetidos todos os passos anteriores.

Foi adicionado 200 µL do reagente solução de lavagem 2 (*wash buffer 2*), afim de continuar a lavagem das pérolas no DNA. Foi realizada um vórtex por 1 minuto na velocidade de 1150 rpm, até a mistura se apresentar totalmente na cor de chocolate. A amostra foi colocada no suporte magnético por 2 minutos até a amostra clarear e os *pérolas* serem depositados ao fundo do tubo. Foi descartado o supernadante com uma pipeta e repetido os passos anteriores. Após o término da segunda lavagem, as amostras foram centrifugadas por 2 minutos na velocidade de 1150 rpm afim de secar as pérolas.

O último passo da extração do material genético consistiu na eluição do DNA. Para isso, foram adicionados 50 µL do reagente solução de eluição às pérolas (*elution solution*). Após a adição, as amostras foram vortexadas por 5 minutos por 1150 rpm até se apresentarem na cor de chocolate. As amostras foram colocadas no suporte magnético por 2 minutos, até clarearem e as pérolas serem depositados ao fundo do tubo. O supernadante, que continha o DNA purificado, foi depositado em um novo tubo de poliestireno de 1.5 mL e armazenado no -70 °C até os próximos processamentos.

### 4.3 Ensaio de PCR em tempo real

O ensaio quantitativo de PCR em tempo real (qPCR) foi performedo usando o kit comercial AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit (*Life Technologies*, Califórnia, EUA), para quantificar a carga viral, através das regiões-alvo U54, U56 e U37 de HCMV, HHV-6 e HHV-7, respectivamente. Este ensaio não permite a diferenciação entre HHV-6A e HHV-6B nas amostras. O Multiplex qPCR foi realizado em uma reação composta pelos seguintes reagentes: 3,85 µL de água RNase/DNAase free (*ThermoFischer Scientific*, Massachusetts, EUA), 1 µL do reagente 25x PCR Enzyme (*Mix Life Technologies*, California, USA), 2.5 µL de cada oligonucleotídeo (3 µM), 2 µL de sonda (0.4µM), 12.5 µL de tampão e 1x PCR Buffer (*Life Technologies*, California, USA).

Os oligonucleotídeos e sondas utilizados neste estudo para a detecção dos betaherpesvírus foram descritos por Raposo e colaboradores (Raposo *et al.*, 2019). Curvas padrões sintéticas foram utilizadas para quantificação absoluta do DNA viral, variando de 5 a  $5 \times 10^8$  cópias/ µL (Raposo *et al.*, 2019). A curva padrão é constituída a partir de diluições seriadas na base 10 de um plasmídeo contendo o DNA alvo previamente quantificado, que então é incluída em um ensaio de PCR em tempo real para determinar a carga viral das amostras teste (Malheiros, 2017). Na tabela 4 estão demonstradas as sequências de primers, sondas e curvas padrão utilizadas na técnica de multiplex qPCR.

**Tabela 4** – Sequências de primers, sondas e curvas padrão utilizadas no ensaio de PCR em tempo real (qPCR)

Vírus	Primer senso	Primer antisenso	Sonda	Curva padrão
HCMV	GGCCGTTA CTGTCTGC AGGA	GGCCTCGTA GTGAAAATTA ATGGT	CCGTATTG GTGCGCG ATCTGTTC AA- NFQ- MGB	TTCGTGGCCTCGTAGTGAAAATTA ATGGTCGTATTTGAACAGATCGC GCACCAATACGGATGCGTTCCTG CAGACAGTAACGGCCCTGATA
HHV-6	AAAGACCT AAATTGCC GCTACCT	GCAAGCTCAT GAACATCGTC A	TTAGATGG TGGTGAGC TGGGATCG GT- NFQ- MGB	TTCGTGCAAGCTCATGAACATCG TCACGTATACCGATCCAGCTCA CCACCATCTAAATGCGTAGGTAG CGGCAATTTAGGTCTTTCTGATA
HHV-7	CGGAAGT CACTGGA GTAATGAC AA	CCAATCCTTC CGAAACCGAT	CTCGCAGA TTGCTTGT TGGCCATG - NFQ-MGB	TTCGTCCAATCCTTCCGAAACCG ATCGTATCATGGCCAACAAGCAA TCTGCGAGATGCGTTTGTGATTAC TCCAGTGACTTCCGCTGATA

Fonte: Raposo *et al.*, 2019

Posteriormente, a solução foi homogeneizada no *vórtex* sofreu uma centrifugação de 30 segundos na centrífuga 5427 R *Eppendorf* (*Eppendorf*, Hamburgo, Alemanha). Após isso, foram adicionados 25 µL da mistura em cada tubo de poliestireno de 1.5 mL devidamente identificados e 5 µL da respectiva amostra de DNA viral extraído anteriormente como consta no item 3.2., e novamente as soluções foram homogeneizadas e centrifugadas por 30 segundos.

Em seguida, as amostras foram colocadas no termociclador para amplificar os genes de interesse do HCMV, HHV-6 e HHV-7 mencionados anteriormente, sendo submetidas ao seguinte ciclo de temperaturas apresentado na tabela 5.

**Tabela 5** – Termociclagem referente ao ensaio de PCR em tempo real

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
Ativação	50 °C	2 minutos
Desnaturação	95 °C	10 minutos
Ativação da <i>Taq-Polimerase</i>	95 °C	10 minutos
Desnaturação*	95 °C	15 segundos
Hibridização*	60 °C	1 minuto
Extensão*	60 °C	1 minuto

\*As etapas de desnaturação, hibridização e extensão tiveram, ao total, 40 ciclos.

#### **4.4 Análise estatística**

Os dados obtidos referentes às variáveis de tipos de lesão, sexo, idade, cor de pele, quadro clínico e tamanho da lesão e os resultados dos testes moleculares foram categorizados e armazenados em um banco de dados criado no *Microsoft Office Excel* (*Microsoft Corporation*, EUA). A análise estatística descritiva foi realizada com distribuição de frequências. Em seguida, a normalidade de distribuição de dados foi avaliada pelo teste Kolmogorov-Smirnov. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi usado para comparar os dados. A correlação foi estimada pelo teste de Spearman (os dados não predefiniram a distribuição normal). Para análise estatística, foi utilizado o programa *Statistical Package for the Social Science SPSS 20.0* (SPSS Inc, Chicago, EUA). Um valor de  $p \leq 0.05$  e intervalos de confiança de 95% foram considerados estatisticamente significativos para todas as análises.



## 5. RESULTADOS

### 5.1 Perfil sociodemográfico e clínico de indivíduos com lesões em glândulas salivares

O presente estudo foi retrospectivo de corte transversal, tendo 68 amostras processadas de material parafinado de pacientes com lesões em glândulas salivares. Foi observado que os indivíduos participantes do estudo possuíam idade entre 5 meses e 68 anos, tendo idade média de 31.33 ( $\pm 16.48$ ) e mediana de 30 anos.

Dentre os pacientes, a maioria era pertencente ao sexo feminino (54,4%), tendo média de idade de 33.19 ( $\pm 14.60$ ) e 45,6% pertencentes ao sexo masculino com média de idade de 29.58 ( $\pm 18.27$ ), tabela 6. Em relação a cor de pele, a maior parte dos indivíduos eram brancos (47,1%), seguido por negros (13,2%) e 39,7% indivíduos sem informações sobre a cor de pele.

Em relação aos tipos de lesão neoplásica e não neoplásica, foi observado que 35/68 amostras parafinadas eram classificadas em lesão não neoplásica do tipo mucocele (51,5%), 27/68 amostras de lesão neoplásica do tipo adenoma pleomórfico (39,4%) e 6/68 amostras de lesão neoplásica do tipo carcinoma mucoepidermoóide (8,8%).

Quando observados os tipos de lesão em relação ao sexo dos indivíduos, observa-se que o sexo feminino apresentou maior predominância a apresentar qualquer tipo de lesão em relação aos indivíduos do sexo masculino. A lesão neoplásica do tipo adenoma mucoepidermoóide foi a mais predominante entre os indivíduos do sexo feminino (26,5%) e 30,9% dos indivíduos do sexo masculino apresentaram a lesão não neoplásica do tipo mucocele como a mais predominante. Quando avaliamos as variáveis tipo de lesão e sexo, observa-se correlação positiva e moderada através do teste de Spearman com significância estatística ( $r=0.252$ ;  $p=0.010$ ), tabela 6.

Foi observado que as idades entre 10-20 anos e 30-40 anos, foram as faixas etárias nas quais foram mais detectadas lesões salivares, apresentando 23,5% e 20,6% das lesões, respectivamente. Apesar destes grupos serem mais vulneráveis, houve uma inversão nos tipos de lesões em glândulas salivares. Foi observado que a idade e o tipo de lesão salivar apresentam correlação forte e positiva ( $r=0.503$ ) e significância estatística ( $p=0.000$ ).

Quanto ao quadro clínico dos pacientes com lesões salivares, as lesões se apresentavam em forma de nódulos em glândulas salivares em 36,7% dos indivíduos, porém 38,2% não apresentavam dados sobre o quadro clínico. Em relação ao local das lesões, observa-se que maioria das lesões foram localizadas na região dos lábios superior e inferior, 11,7% e 20,5%, respectivamente, apresentando tamanho superior a 4 cm, tabela 6.

**Tabela 6.** Distribuição das características demográficas e clínicas dos pacientes com lesões em glândula salivar de acordo com tipos de lesão

				X <sup>2</sup>	r	Total = 68
<b>Tipo de Lesão</b>	Mucocele	Adenoma	Carcinoma	p=0.000	1.000	68(100%)
	35(51,5%)	27(39,7%)	6 (8,8%)			
<b>Sexo</b>				p=0.010	0.252	
Masculino	21(30,9%)	9(13,2%)	1 (1,5%)			31(45,6%)
Feminino	14(20,6%)	18(26,5%)	5 (7,3%)			37(54,4%)
<b>Idade</b>				p=0.000	0.503	
0-10	5 (7,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)			5 (7,3%)
10-20	13(19,1%)	3 (4,4%)	0 (0,0%)			16(23,5%)
20-30	8 (11,7%)	5 (7,3%)	1 (1,4%)			14(20,6%)
30-40	5 (7,3%)	9(13,2%)	0 (0,0%)			14(20,6%)
40-50	1 (1,4%)	5 (7,3%)	2 (2,9%)			8 (11,8%)
50-60	1 (1,4%)	3 (4,4%)	3 (4,4%)			7 (10,3%)
> 60	1 (1,4%)	2 (2,9%)	0 (0,0%)			3 (4,4%)
Sem dados	1 (1,4%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)			1 (1,5%)
<b>Cor de pele</b>				-	1.000	
Branco	24(35,3%)	5 (7,3%)	3 (4,4%)			32(47,1%)
Negro	4 (5,9%)	4 (5,9%)	1 (1,5%)			9 (13,2%)
Sem dados	7 (10,3%)	18(26,5%)	2 (2,9%)			27(39,7%)
<b>Quadro clínico</b>				-	-	
Nódulo	7 (10,2%)	17 (25%)	1 (1,5%)			25(36,8%)
Nódulo/pápula	4 (5,9%)	1 (1,5%)	4 (5,9%)			9(13,2%)
Vesícula/bolha	8 (11,8%)	0 (0%)	0 (0%)			8 (11,8%)
Sem dados	16(23,5%)	9 (13,2%)	1 (1,5%)			26(38,2%)

<b>Localização</b>				-	-
Lábio superior	8 (11,7%)	0 (0%)	0 (0%)		8 (11,8%)
Lábio inferior	14(20,5%)	0 (0%)	0 (0%)		14(20,6%)
Língua	1 (1,4%)	1 (1,4%)	1 (1,4%)		3 (4,4%)
Ventre da língua	2 (2,9%)	0 (0%)	0 (0%)		2 (2,9%)
Mucosa jugal	1 (1,4%)	1 (1,4%)	2 (2,9%)		4 (5,9%)
Mucosa labial	5 (7,3%)	0 (0%)	0 (0%)		5 (7,3%)
Mucosa labial inferior	3 (4,4%)	0 (0%)	0 (0%)		3 (4,4%)
Região retromolar	0 (0%)	0 (0%)	1 (1,4%)		1 (1,5%)
Assoalho bucal	1 (1,4%)	0 (0%)	0 (0%)		1 (1,5%)
Palato duro	0 (0%)	16(23,5%)	2 (2,9%)		18(26,5%)
Palato mole	0 (0%)	4 (5,8%)	0 (0%)		4 (5,9%)
Sem dados	0 (0%)	5 (7,3%)	0 (0%)		5 (7,3%)
<b>Tamanho da lesão</b>				-	-
≤ 4 cm	11(16,2%)	7 (10,3%)	5 (7,3%)		23(33,8%)
> 4 cm	0 (0%)	2 (2,9%)	0 (0%)		2 (2,9%)
Sem dados	24(35,3%)	18(26,5%)	1 (1,5%)		43(63,2%)

p-valor e correlações através do teste de Spearman (r). O Teste de Spearman foi utilizado para realizar as comparações entre a variável tipo de lesão com as variáveis de idade, sexo e cor da pele.

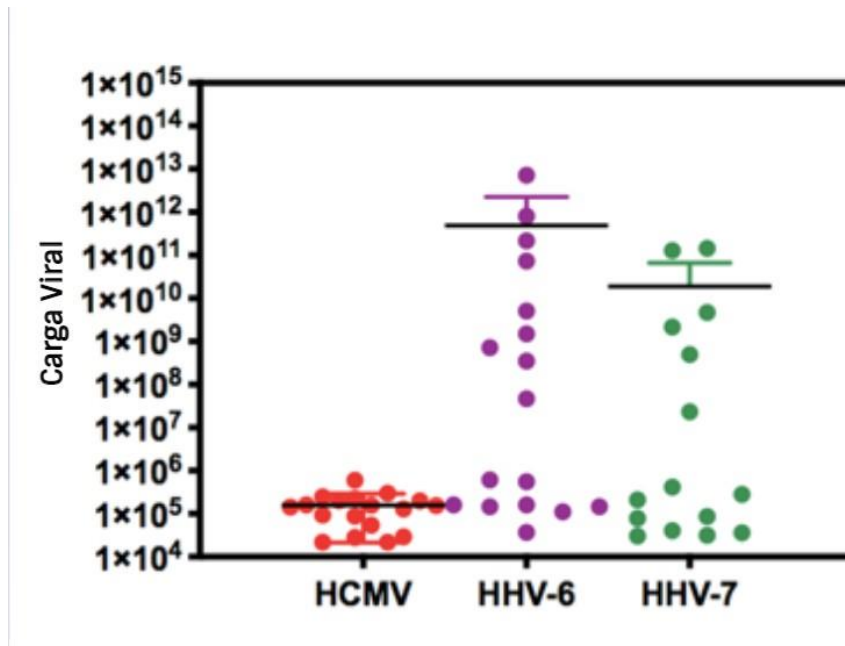
## 5.2 Detecção de HCMV, HHV-6 e HHV-7 em amostras de lesões salivares através do ensaio de qPCR

Do total de 68 amostras processadas, apenas 18 (26,5%) foram negativas para todos os *Betaherpesvírus humano* analisados. Entre as amostras positivas, 36 foram positivas para HCMV (52,9%), 32 para HHV-6 (47,0%) e 27 para HHV-7 (39,7%). O HCMV foi encontrado na maioria das amostras e com a maior média de carga viral 8.09 ( $\pm$  2.89), em relação ao HHV-6 (8.05;  $\pm$  2.60) e HHV-7 (7.90;  $\pm$  2.66), figura 4.13. Através do coeficiente de correlação de Spearman foi encontrada correlação positiva

e moderada entre as cargas virais de HCMV e HHV-6 ( $r\hat{o}= 0.238$ ) ( $p= 0.003$ ), HCMV e HHV-7 ( $r\hat{o}=0.468$ ) ( $p=0.003$ ) e HHV-6 e HHV-7 ( $r\hat{o}= 0.419$ ) ( $p= 0.014$ ), porém sem significância estatística.

Foi observado que os indivíduos pertencentes ao sexo masculino apresentaram predominância na detecção de HHV-6 (46,9%), enquanto os indivíduos do gênero feminino apresentaram maior detecção de HCMV e HHV-7, respectivamente 66,6% e 63,0%. Foi encontrada diferença estatística entre o sexo e o vírus detectado ( $p=0.042$ ).

Foi visto que indivíduos entre 10-20 e 30-40 anos apresentaram maior detecção de HCMV, HHV-6 e HHV-7. Em relação à faixa etária, foi encontrada correlação negativa HCMV ( $r\hat{o}= -0.038$ ) e correlação positiva entre HHV-6 ( $r\hat{o}= 0,066$ ) e HHV-7 ( $r\hat{o}=0,011$ ), porém sem significância estatística entre HCMV ( $p=0,794$ ), HHV-6 ( $p=0,0688$ ) e HHV-7 ( $p=0,946$ ), tabela 7.



**Figura 4.13.** Carga viral de HCMV, HHV-6 e HHV-7 em amostras parafinadas de indivíduos com neoplasia em glândula salivar.

**Tabela 7 – Detecção de HCMV, HHV-6 e HHV-7 entre os pacientes com lesões em glândula salivar.**

	HCMV	HHV-6	HHV-7	
<b>Variável</b>	<b>n=36 (52.9%)</b>	<b>n= 32 (47.0%)</b>	<b>N= 27 (39.0%)</b>	<b>p-valor</b>
<b>Sexo</b>				$p=0.042$
Feminino	24 (66,6%)	17 (53,1%)	17 (63,0%)	
Masculino	12 (33,3%)	15 (46,9%)	10 (37,0%)	
<b>Idade</b>	$p= 0.794$	$p= 0.688$	$p=0.946$	-
0 – 10 (n = 5)	3 (8,3%)	3 (9,4%)	1 (3,7%)	
10 – 20 (n = 15)	10 (27,8%)	9 (28,1%)	8 (29,6%)	
20 – 30 (n = 13)	4 (11,1%)	4 (12,5%)	5 (18,5%)	
30 – 40 (n = 16)	10 (27,8%)	7 (21,9%)	7 (26,0%)	
40 – 50 (n = 8)	3 (8,3%)	3 (9,4%)	2 (7,4%)	
50 – 60 (n = 6)	4 (11,1%)	4 (12,5%)	3 (11,1%)	
> 60 (n = 4)	0 (0%)	1 (3,1%)	0 (0%)	
Sem dados (n = 3)	2 (5,5%)	1 (3,1%)	1 (3,7%)	

### 5.3 Análises entre as detecções de Betaherpesvírus humano e os tipos de lesões em glândulas salivares.

Em relação às lesões em glândula salivar foi observado que no adenoma pleomórfico foi detectada a maior prevalência de HCMV, HHV-6 e HHV-7 quando comparado com os demais tipos de lesões salivares.

Na lesão neoplásica do tipo adenoma verificamos maior detecção do HHV-6 em relação ao HCMV e HHV-7, apresentando taxa de 65,6% (21/32) de detecção. Além disso, na lesão do tipo mucocele foram detectados percentuais de 38,9% para HCMV, 31,02% para HHV-6 e 37,0% para HHV7. Também foi observado que na lesão do tipo carcinoma mucoepidermóide foram detectados percentuais de 11,1% para HCMV, 3,1% para HHV-6 e 7,4% para HHV-7. Através do teste de correlação de Spearman não foi encontrada correlação entre o vírus e o tipo de lesão, sem

diferença estatística entre essas duas variáveis (HCMV  $p=0.608$ ; HHV-6  $p=0.636$ ; HHV-7  $p=0.475$ ) (Tabela 8).

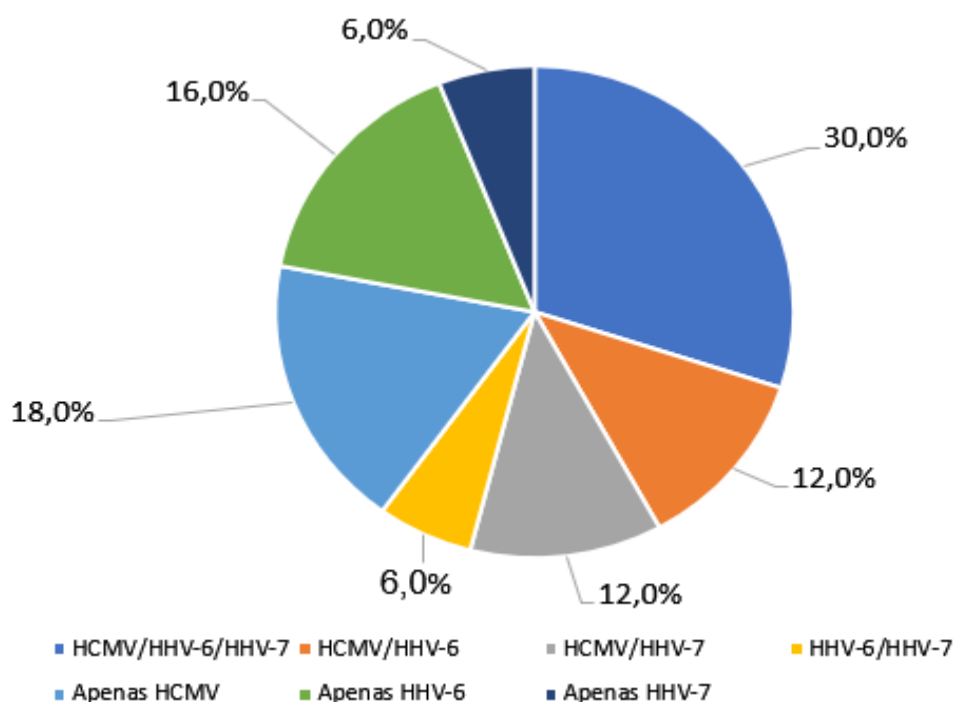
**Tabela 8 – Detecção de HCMV, HHV-6 e HHV-7 em lesões de glândula salivar**

	HCMV (n=36)	HHV-6 (n=32)	HHV-7 (n=27)
<b>p-valor</b>	$p=0,608$	$p=0,636$	$p=0,475$
<b>Lesão</b>			
Adenoma	18 (50,0%)	21 (65,6%)	15 (55,5%)
pleomórfico (n=35)			
Mucocele (n=27)	14 (38,9%)	10 (31,2%)	10 (37,0%)
Carcinoma mucoepidermóide (n=6)	4 (11,1%)	1 (3,1%)	2 (7,4%)

#### **5.4 Comparação das taxas de coinfeccções e monoinfeccções entre HCMV, HHV-6 e HHV-7 entre as lesões em glândulas salivares**

As taxas de coinfeccções entre HCMV, HHV-6 e HHV-7 nas amostras parafinadas de neoplasias em glândulas salivares foram analisadas. Dentre as 50 amostras que apresentavam positividade para alguns dos vírus, 18 amostras foram negativas. Foi observada que 20 amostras (40,0%) apresentavam monoinfeccção, sendo a monoinfeccção por HCMV detectada em 9 amostras (18,0%), HHV-6 em 8 amostras (16,0%) para e HHV-7 em 3 amostras (6,0%).

As coinfeccções foram detectadas em 30 amostras (60,0%). Uma alta taxa de tripla-infeccção (HCMV/HHV-6/HHV-7) foi encontrada (n=15; 30%), seguida de coinfeccção por HCMV/HHV-6 (n=6; 12,0%), HCMV/HHV-7 (n=n=6; 12,0%) e HHV-6/HHV-7 (n=3; 6,0%) Figura 4.14.



**Figura 4.14** – Porcentagem de coinfeções entre HCMV/HHV-6/HHV-7 detectadas nos indivíduos alvo do estudo.

Além disso, foram observadas as coinfeções e monoinfeções de acordo com os tipos de lesões salivares. Foi encontrado a maior taxa de coinfeções (60,0%; n=18) nas lesões do tipo mucoccele, seguido por 33,3% (n=10) em adenoma pleomórfico e 6,7% (n=2) em carcinoma mucoepidermoíde (Tabela 9).

Na lesão do tipo mucoccele, foi observado 33,3% de positividade para a tripla infecção HCMV/HHV-6/HHV-7, 16,7% para HCMV, HHV-6, 6,7% para HCMV/HHV-7 e 3,3% para HHV-6/HHV-7. Na lesão do tipo adenoma pleomórfico, foi observado 16,7% para a tripla infecção, 3,3% para HCMV/HHV-6, 6,7% para HCMV/HHV-7 e HHV-6/HHV-7. Já a lesão do tipo carcinoma mucoepidermoíde somente foi observada coinfeção entre HCMV/HHV-7, tendo 6,7%.

Em relação às monoinfeções, foi observado que a lesão do tipo adenoma pleomórfico apresentou maiores taxas de monoinfeções (45,0%; n=9), seguida pela lesão do tipo mucoccele (n=8;40,0%) e carcinoma mucoepidermoíde (15,0%; n=3).

Na lesão do tipo mucoccele, foi observada alta taxa de infecção causada por HHV-6 (25,0%; n=5), seguida por 10,0% (n=2) de HHV-7 e 5,0% (n=1) de HCMV. Na lesão do tipo adenoma pleomórfico foi observado 30,0% (n=6) de infecção causada por HCMV, 10,0% (n=2) por HHV-6 e 5,0% (n=1) de HHV-7. Por fim, na lesão do tipo carcinoma mucoepidermoíde, foi observada apenas infecções causadas por HCMV

tendo 10,0% (n=2) de positividade e 5,0% (n=1) de infecção causada por HHV-6, sendo ausente a infecção causada por HHV-7.

**Tabela 9** – Coinfecções e monoinfecções entre HCMV, HHV-6 e HHV-7 nos diferentes tipos de lesões em glândulas salivares

<b>Coinfecções (N=30)</b>	<b>Mucocele (N= 26)</b>	<b>Adenoma (N= 19)</b>	<b>Carcinoma (N=5)</b>	<b>Total coinfecções</b>
HCMV/HHV-6/HHV-7	10 (33,3%)	5 (16,7%)	0 (0,0%)	15 (50,0%)
HCMV/HHV-6	5 (16,7%)	1 (3,3%)	0 (0,0%)	6 (20,0%)
HCMV/HHV-7	2 (6,7%)	2 (6,7%)	2 (6,7%)	6 (20,0%)
HHV-6/HHV-7	1 (3,3%)	2 (6,7%)	0 (0,0%)	3 (10,0%)
<b>Total (lesões)</b>	18 (60,0%)	10(33,3%)	2 (6,7%)	-
<b>Monoinfecções (N=20)</b>				<b>Total monoinfecções</b>
Apenas HCMV	1 (5,0%)	6 (30,0%)	2 (10,0%)	9 (45,0%)
Apenas HHV-6	5 (25,0%)	2 (10,0%)	1 (5,0%)	8 (40,0%)
Apenas HHV-7	2 (10,0%)	1 (5,0%)	0 (0,0%)	3 (15,0%)
<b>Total (lesões)</b>	8 (40,0%)	9 (45,0%)	3 (15,0%)	-



## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo foi analisado as infecções causadas por HCMV, HHV-6 e HHV-7 em indivíduos com lesões salivares do tipo adenoma pleomórfico, carcinoma mucoepidermoíde e mucocele. Em relação aos tipos de lesões salivares, a lesão não neoplásica do tipo mucocele foi a mais comum entre os participantes do estudo.

Um estudo realizado por Junior e colaboradores, demonstraram que em 3.127 amostras de neoplasias salivares analisadas no período de 1995 a 2018, a lesão do tipo mucocele foi a mais comum, sendo diagnosticada em 70,6% dos indivíduos, dados similares ao que foi encontrado em nosso estudo (Junior *et al.*, 2020). Além disso, alguns estudos demonstram que além da lesão do tipo mucocele, a lesão não neoplásica do tipo adenoma pleomórfico também é a lesão salivar mais comum, o que corresponde a esta lesão ter sido diagnosticada em grande parte dos indivíduos participantes deste estudo (Senthilkumar & Nazargi Mahabob, 2012; Reinhemer, Cordeiro e Rivero, 2019).

Em relação ao sexo, foi observado que indivíduos do sexo feminino apresentavam maior predominância a terem qualquer tipo de lesão salivar quando comparados com indivíduos do sexo masculino, sendo estes mais predominantes a apresentarem a lesão do tipo mucocele. Dados oriundos do Brasil e da Índia têm demonstrado que o adenoma pleomórfico ocorre em maior predominância em indivíduos do sexo feminino conforme demonstrado em nosso estudo, ocorrendo em aproximadamente 60% dos casos (Thomas, D & Thomas, S., 2017; Cardoso *et al.*, 2014). Além disso, em nosso estudo a grande maioria dos indivíduos do sexo masculino apresentou a lesão do tipo mucocele como a mais prevalente, o que foi pensado que talvez este tipo de lesão exibisse preferência a ocorrer em indivíduos do sexo masculino. Porém, um estudo realizado por Ferreira e colaboradores, demonstraram que a lesão do tipo mucocele não exhibe preferência entre sexo, podendo ocorrer em qualquer gênero e em qualquer glândula salivar (Ferreira *et al.*, 2015).

Além das características de sexo, a faixa etária também demonstrou relação com o aparecimento de lesões salivares. Foi observado que indivíduos compreendidos entre 30-40 anos de idade apresentaram, em maior taxa, a lesão do tipo adenoma pleomórfico, enquanto indivíduos das faixas 40-50 e 50-60 anos apresentaram maior predominância de carcinoma mucoepidermoíde. Alguns dados epidemiológicos têm demonstrado que a lesão do tipo adenoma pleomórfico pode ocorrer em qualquer faixa etária, tendo prevalência em indivíduos adultos jovens entre

a 4ª e a 6ª década de vida (Cardoso *et al.*, 2014). O perfil epidemiológico em relação ao sexo e ocorrência de lesões salivares foi descrito por Vargas e colaboradores, foi observado que a predominância destas lesões era maior em mulheres a partir da 4ª década, ou seja, dos 30 aos 40 anos de idade, como apresentado neste estudo (Vargas *et al.*, 2002). Já em um outro estudo realizado no Reino Unido por Jones e colaboradores, mostrou que o carcinoma mucoepidermoíde foi encontrado em indivíduos de 16 a 64 anos de idade, possuindo o adenoma pleomórfico incidente em indivíduos com idades entre 14 a 95 anos, demonstrando que lesões em glândula salivar são possíveis de ocorrer mesmo em indivíduos mais jovens (Jones *et al.*, 2008).

Vários vírus de DNA que infectam humanos, como os *Betaherpesvirus humano*, têm sido detectados em uma grande variedade de tumores, sendo a maioria destes patógenos também detectados em amostras de saliva e de tecidos salivares (Fox *et al.*, 1990; Sada *et al.*, 1996; Melnick *et al.*, 2013; Shanehsazzadeh *et al.*, 2014; Almanan *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2017; Gabrielli *et al.*, 2017; Razonable, 2019). Neste estudo, dentre as 68 amostras parafinadas processadas, o HCMV apresentou maior prevalência dentre os três vírus estudados, tendo 52,9% de positividade. É descrito na literatura que o HCMV, assim como o HHV-6 e HHV-7, possui tropismo por células epiteliais de glândulas salivares, tendo atividade replicativa em células acinares, além de estabelecer latência nesses órgãos (Jayaraj *et al.*, 2015; Waters *et al.*, 2019).

É visto na literatura que estes vírus têm sido detectados em amostras de saliva de pacientes saudáveis e imunocomprometidos e em amostras de tecidos salivares e neoplásicos, o que corresponde com os achados do nosso estudo, visto que as glândulas salivares podem atuar como local de atividade destes vírus (Sada *et al.*, 1996; Magalhães *et al.*, 2010; Shanehsazzadeh *et al.*, 2014; Jayaraj *et al.*, 2015; Waters *et al.*, 2019).

Em um estudo conduzido por Waters e colaboradores em amostras de saliva e plasma de indivíduos com transplante renal, demonstrou que o DNA do HCMV foi presente em 11/82 amostras de saliva e 16/82 amostras de plasma, possuindo 9/82 indivíduos com DNA viral presente nos dois tipos de amostra, sendo mais frequente o DNA viral encontrado em amostras de saliva do que em amostras de plasma (Waters *et al.*, 2019). Em um estudo conduzido por Magalhães e colaboradores em 182 amostras de saliva de indivíduos residentes do Rio de Janeiro, demonstrou prevalência de 9,8% (18/182) de HHV-6, com detecção de 7,1% de HHV-6A (13/182) e HHV-6B em 2,7% (5/182). Em relação ao HHV-7, o vírus foi detectado em 12,6%

(23/182) amostras processadas, sendo demonstrado que o HHV-6 foi o vírus mais prevalente dentre os indivíduos participantes do estudo (Magalhães *et al.*, 2010). Demonstrando que a saliva possui papel na transmissão do HCMV, uma vez que encontrado DNA viral nestes fluídos, além de ser uma amostra biológica importante no diagnóstico deste vírus.

Além da detecção do DNA do HCMV em amostras de saliva, existem alguns estudos que demonstram a detecção do material genético deste vírus em tecidos de glândulas salivares. Chen e colaboradores demonstraram em pacientes do Norte da Itália com neoplasias em glândula salivar, que dentre 84 amostras de neoplasias em glândula salivar (80 amostras de tumores de glândulas parótidas e 4 de tumores de glândulas submandibulares) e 28 de glândulas salivares saudáveis, o DNA do HCMV foi detectado em 5 amostras de neoplasia salivar e em 1 amostra de glândula salivarr saudável, sendo observado alta frequência do DNA viral em 3/5 amostras de neoplasias malignas de glândulas salivares (Chen *et al.*, 2017). Demonstrando que, além de ser detectado em amostras de saliva, o HCMV pode também ser detectado em amostras de tecidos de neoplasias salivares e em glândulas salivares saudáveis.

Os três vírus estudados (HCMV, HHV-6 e HHV-7) foram detectados em grande parte dos indivíduos participantes do estudo, e ainda foi observado que as faixas etárias entre 10-20 e entre 30-40 anos de idade foram as mais prevalentes para estes vírus. É observado na literatura que o HCMV, o HHV-6 e o HHV-7 são capazes de infectar indivíduos na primeira infância, tornando-se latentes para o resto da vida do hospedeiro (Ongrándi *et al.*, 2017; Handous *et al.*, 2020). Dados epidemiológicos de diversos países indicam que a infecção primária pelo HHV-6 ocorre aos 2 anos de idade, sendo incomum em indivíduos adultos, tendo reativações virais que podem ocorrer em qualquer idade do indivíduo (King e Khalili, 2019). Em relação ao HHV-7, dados de vários países têm sugerido que, geralmente, a infecção também ocorre na infância a partir dos 2 anos de idade, tendo cerca de 75% das crianças soropositivas a partir dos 5 anos de idade (Flamand *et al.*, 2014). Já em relação ao HCMV, as crianças geralmente são infectadas pelo vírus a partir dos 5 anos de idade, entretanto, a metade dos indivíduos adultos são capazes de se infectarem aos 40 anos de idade (CDC, 2010), o que corresponde a ser o segundo grupo mais prevalente nos dados deste estudo.

Em relação a detecção de betaherpesvírus nos tipos de lesões salivares, foi visto que o adenoma pleomórfico foi a lesão na qual mais teve detecção de HCMV, HHV-6 e HHV-7, sendo mais prevalente para o HHV-6. É descrito na literatura que a

presença do HHV-6 em certos tipos de câncer, entretanto, a detecção do vírus em células cancerígenas é insuficiente para a definição de um papel direto do HHV-6 na tumorigênese (Eliassen *et al.*, 2018). Além disso, o HHV-6 não é considerado diretamente oncogênico, podendo atuar como um cofator que indiretamente estimula o crescimento de células tumorais e, em alguns casos, cooperar com a atividade viral de alguns vírus, como o HPV e o EBV (Eliassen *et al.*, 2018).

A tripla infecção HCMV/HHV-6/HHV-7 coinfeções foi a mais detectada lesões em glândulas salivares, tendo o adenoma pleomórfico como a lesão na qual foi mais detectada os diferentes tipos de coinfeções. É visto na literatura que estas coinfeções são possíveis de acontecer, entretanto, ainda não é claramente descrito como funciona a dinâmica de coinfeção entre estes vírus. A coinfeção entre o HCMV, HHV-6 e HHV-7 foi descrita em um estudo no qual foi realizado a detecção de IgG e IgM em pacientes com leucemia, demonstrando que 15,8% das amostras apresentavam coinfeção de HCMV/HHV-6, 5,3% apresentavam HCMV/HHV-7 e 2,1% apresentando tripla-infecção de HCMV/HHV-6/HHV-7 (Handous *et al.*, 2020).

Além disso, a coinfeção entre HHV-6, HHV-7 e parvovírus B19 foi descrita em amostras de sangue de pacientes com diagnóstico de encefalomielite crônica, demonstrando que a coinfeção entre HHV-6/HHV-7 foi a menos detectada entre os pacientes, tendo taxa de 9,2% (Chapenko *et al.*, 2012). Estes dados se assemelham com o encontrado neste estudo, apresentando também a menor detecção de coinfeção entre HHV-6/HHV-7.

A presença de carga viral e replicação ativa (detecção de mRNA) de HHV-6 e HHV-7 em fluido oral foi descrita recentemente pelo nosso grupo, em artigo publicado por Raposo e colaboradores em amostras de saliva. No estudo, os autores demonstraram que a carga viral de HHV-6 e HHV-7 aumentou após o comprometimento imunológico desses pacientes causado após transplante renal. Os autores relatam que todo o processo de replicação viral do HHV-6 e HHV-7 é independente e pode ocorrer nas glândulas salivares, podendo ter sinergia positiva entre os vírus. Além disso, a comparação entre cargas virais mostrou que o HHV-6 e o HHV-7 apresentaram replicação viral simultânea nesses indivíduos (Raposo *et al.*, 2020). Respondendo à coinfeção entre HHV-6/HHV-7 encontrada em nosso estudo. No presente estudo foi observado que os *Betaherpesvirus humano* como o HCMV, HHV-6 e HHV-7 podem ser detectados em tecidos de glândula salivar. A alta detecção de HCMV, HHV-6 e HHV-7 e a presença de carga viral em lesões em glândulas salivares podem ser importantes para entender o papel destes patógenos

nestas patogenias, porém são necessários mais estudos para investigar a replicação destes vírus ou patógenos nas glândulas salivares, na tentativa de se estabelecer relação causal entre a detecção destes e a patologia apresentada.

## 7. Conclusões

Dentre os 68 indivíduos participantes do estudo, a maioria era pertencente ao sexo feminino e autodeclarados como brancos. Em relação ao tipo de lesão salivar, a lesão do tipo mucocele foi a mais predominante entre os indivíduos.

A detecção de betaherpesvírus humano em amostras parafinadas de lesões salivares foi alta, 52,9% para HCMV, 47,05% para HHV-6 e 39,7% para HHV-7, sendo o HHV-6 mais detectado na lesão do tipo adenoma pleomórfico e carcinoma mucoepidermoíde em idades mais avançadas.

Não houve correlação entre a carga viral de HCMV, HHV-6 e HHV-7 e os tipos de lesões adenoma pleomórfico, carcinoma mucoepidermoíde e mucocele.

A lesão do tipo mucocele foi a mais predominante entre os indivíduos, em relação aos demais tipos de lesão. Foi observado alta detecção de HHV-6 na lesão do tipo adenoma pleomórfico.

A maioria das coinfeções detectadas foi a tripla-infecção HCMV/HHV-6/HHV-7, sendo esta mais prevalente na lesão do tipo adenoma pleomórfico.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ablashi, D. V. *et al.* Human B-lymphotropic virus (human herpesvirus-6). *J. Virol. Methods* **21**, 29–48 (1988). doi: 10.1016/0166-0934(88)90050-X
2. Adel K El-Naggar *et al.* P. J. S. WHO Classification of Head and Neck Tumours. Fourth edition - WHO - OMS -. in *IARC, Lyon* (2017). ISBN: 9789283224389
3. Agut, H., Bonnafous, P. & Gautheret-Dejean, A. Update on infections with human herpesviruses 6A, 6B, and 7. *Medecine et Maladies Infectieuses* vol. 47 83–91 (2017). doi: 10.1016/j.medmal.2016.09.004
4. Almanan, M. *et al.* Tissue-specific control of latent CMV reactivation by regulatory T cells. *PLOS Pathog.* **13**, e1006507 (2017). doi: 10.1371/journal.ppat.1006507
5. Almeida, L. N., Azevedo, R. S., Amaku, M. & Massad, E. Cytomegalovirus seroepidemiology in an urban community of São Paulo, Brazil. *Rev. Saude Publica* (2001) doi:10.1590/S0034-89102001000200004.
6. Bagán Sebastián, J. V., Silvestre Donat, F. J., Peñarrocha Diago, M. & Milián Masanet, M. A. Clinico-pathological study of oral mucoceles. *Av. Odontoestomatol.* (1990). ISSN: 02131285. PMID: 2094260
7. Bello, I. O. *et al.* Epithelial Salivary Gland Tumors in Two Distant Geographical Locations, Finland (Helsinki and Oulu) and Israel (Tel Aviv): A 10-Year Retrospective Comparative Study of 2,218 Cases. *Head Neck Pathol.* **6**, 224–231 (2012). doi: 10.1007/s12105-011-0316-5
8. Brady, R. C. & Bernstein, D. I. Treatment of herpes simplex virus infections. *Antiviral Research* (2004) doi:10.1016/j.antiviral.2003.09.006.doi:10.1016/j.antiviral.2003.09.006
9. Candeias, J. A. N., Stewien, K. E. & Barbosa, V. Serologic study of cytomegalovirus infections. *Rev. Saude Publica* **8**, 257–263 (1974). doi: 10.1590/s0034-89101974000300002
10. Cannon, M. J., Schmid, D. S. & Hyde, T. B. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev. Med. Virol.* **20**, 202–213 (2010). doi: 10.1002/rmv.655
11. Cannon, M. J., Schmid, D. S. & Hyde, T. B. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev. Med. Virol.* **20**, 202–213 (2010). doi: 10.1002/rmv.655
12. Cardoso, C. S. *et al.* Caso Clínico Adenoma pleomórfico em mucosa jugal: relato de caso Pleomorphic adenoma on the buccal mucosa: a case report. *Rev Odontol Bras Cent.* **23**, (2014). ISSN: 1981-3708
13. Caserta, M. T. Human Herpesviruses 6 and 7 (Roseola, Exanthem Subitum). in *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases* 1081-1088.e4 (Elsevier Inc., 2018). doi:10.1016/B978-0-323-40181-4.00207-3.
14. Centers for Disease Control and Prevention. Cytomegalovirus (CMV) and congenital CMV Infection. *Cdc* (2010). Available in: <https://www.cdc.gov/cmvi/index.html>

15. Chan, P. K. S. *et al.* Case report: Human herpesvirus 7 associated fatal encephalitis in a peripheral blood stem cell transplant recipient. *J. Med. Virol.* **66**, 493–496 (2002). doi: 10.1002/jmv.2171
16. Chapenko, S. *et al.* Association of active human herpesvirus-6, -7 and parvovirus B19 infection with clinical outcomes in patients with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *Adv. Virol.* (2012) doi:10.1155/2012/205085.
17. Chen, A. A. *et al.* Oncogenic DNA viruses found in salivary gland tumors. *Oral Oncol.* **75**, 106–110 (2017). doi: 10.1016/j.oraloncology.2017.11.005
18. Chen, A. A. *et al.* Oncogenic DNA viruses found in salivary gland tumors. *Oral Oncol.* **75**, 106–110 (2017). doi: 10.1016/j.oraloncology.2017.11.005
19. Chi, T. H., Chen, R. F., Yuan, C. H. & Chien, S. T. Submandibular gland mucocele: A case report and literature review. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* (2017). ISSN: 19405901
20. Clark, D. A., Emery, V. C. & Griffiths, P. D. Cytomegalovirus, human herpesvirus-6, and human herpesvirus-7 in hematological patients. *Seminars in Hematology* (2003) doi:10.1016/S0037-1963(03)70007-9.
21. Close, W. L., Anderson, A. N. & Pellett, P. E. Betaherpesvirus virion assembly and egress. in *Advances in Experimental Medicine and Biology* (2018). doi:10.1007/978-981-10-7230-7\_9.
22. CMV Fact Sheet for Healthcare Providers | CDC. <https://www.cdc.gov/cmV/fact-sheets/healthcare-providers.html>. Acces in: 26.03.2021
23. Cohen, J. I. Herpesvirus latency. *Journal of Clinical Investigation* vol. 130 3361–3369 (2020). doi: 10.1172/JCI136225
24. Cohen, J. I. Human Herpesvirus Types 6 and 7 (Exanthem Subitum). in *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* vol. 2 1772-1776.e1 (Elsevier Inc., 2014). doi: 10.1016/B978-1-4557-4801-3.00142-9
25. Conceição, J. G. *et al.* Oral mucoceles: A clinical, histopathological and immunohistochemical study. *Acta Histochem.* (2014) doi:10.1016/j.acthis.2013.04.015.
26. Connolly, S. A., Jackson, J. O., Jardetzky, T. S. & Longnecker, R. Fusing structure and function: A structural view of the herpesvirus entry machinery. *Nature Reviews Microbiology* (2011) doi:10.1038/nrmicro2548.
27. Cunha, J. L. S. *et al.* Epidemiologic analysis of salivary gland tumors over a 10-years period diagnosed in a Northeast Brazilian population. *Med. Oral Patol. Oral y Cir. Bucal* (2020) doi:10.4317/medoral.23532.
28. Da Silva, L.P. *et al.* Salivary gland tumors in a Brazilian population: A 20-year retrospective and multicentric study of 2292 cases. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* (2018). ISSN: 1878-4119
29. Dahl, H. *et al.* Reactivation of human herpesvirus 6 during pregnancy. *J. Infect. Dis.* **180**, 2035–2038 (1999). Doi: 10.1086/315115



30. Davison, A. J. & Bhella, D. Chapter 14 Comparative genome and virion structure. *Hum. Herpesviruses Biol. Ther. Immunophyl.* **2**, (2007).
31. Davison, A. J. Herpesviruses: General Features☆. in *Reference Module in Biomedical Sciences* (2014). doi:10.1016/b978-0-12-801238-3.04812-1.
32. Davison, A. J. Overview of classification. in *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis* (2007). doi:10.1017/CBO9780511545313.002.
33. Dziurzynski, K. *et al.* Consensus on the role of human cytomegalovirus in glioblastoma. *Neuro. Oncol.* (2012) doi:10.1093/neuonc/nor227.
34. Eliassen, E. *et al.* Human herpesvirus 6 and malignancy: A review. *Frontiers in Oncology* vol. 8 512 (2018). doi: 10.3389/fonc.2018.00512
35. Evans, C. M., Kudesia, G. & McKendrick, M. Management of herpesvirus infections. *International Journal of Antimicrobial Agents* (2013) doi:10.1016/j.ijantimicag.2013.04.023.
36. Ferreira, S. H. *et al.* An unusual presentation of oral mucocele in a young pediatric patient (2015). vol. 21. ISSN: 1519-4442
37. Flamand, L., Lautenschlager, I., Krueger, G. R. F. & Ablashi, D. V. *Human Herpesviruses HHV-6A, HHV-6B, and HHV-7, Third Edition.* (Elsevier B.V., 2014). doi:10.1016/C2011-0-08453-3.
38. Forte, E., Zhang, Z., Thorp, E. B. & Hummel, M. Cytomegalovirus Latency and Reactivation: An Intricate Interplay With the Host Immune Response. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* vol. 10 130 (2020). doi: 10.3389/fcimb.2020.00130
39. Fox, J. D., Briggs, M., Ward, P. A. & Tedder, R. S. Human herpesvirus 6 in salivary glands. *Lancet* **336**, 590–593 (1990). doi: 10.1016/0140-6736(90)93392-3
40. Freitas, R. B., Freitas, M. R. & Linhares, A. C. Evidence of active herpesvirus 6 (variant-A) infection in patients with lymphadenopathy in Belém, Pará, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **45**, 283–288 (2003). doi: 10.1590/S0036-46652003000500008
41. Fujisaki, H. *et al.* Detection of human herpesvirus 7 (HHV-7) DNA in breast milk by polymerase chain reaction and prevalence of HHV-7 antibody in breast-fed and bottle-fed children. *J. Med. Virol.* **56**, 275–279 (1998). doi: 10.1002/(SICI)1096-9071(199811)56:3<275::AID-JMV17>3.0.CO;2-D
42. Gabrielli, L. *et al.* Salivary glands and human congenital cytomegalovirus infection: What happens in early fetal life? *J. Med. Virol.* (2017) doi:10.1002/jmv.24628.
43. Gooden, E., Witterick, I. J., Hacker, D., Rosen, I. B. & Freeman, J. L. Parotid gland tumours in 255 consecutive patients: Mount Sinai Hospital's quality assurance review. *J. Otolaryngol.* (2002) doi:10.2310/7070.2002.34394.
44. Grefte, A. *et al.* Presence of human cytomegalovirus (HCMV) immediate early mRNA but not ppUL83 (lower matrix protein pp65) mRNA in polymorphonuclear and mononuclear leukocytes during active HCMV infection. *J. Gen. Virol.* **75**, 1989–1998 (1994). doi: 10.1099/0022-1317-75-8-1989

45. Griffiths, P., Baraniak, I. & Reeves, M. The pathogenesis of human cytomegalovirus. *J. Pathol.* (2015) doi:10.1002/path.4437.
46. Guzzo, M. *et al.* Major and minor salivary gland tumors. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (2010) doi:10.1016/j.critrevonc.2009.10.004.
47. Guzzo, M. *et al.* Major and minor salivary gland tumors. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (2010) doi:10.1016/j.critrevonc.2009.10.004.
48. Hall, C. B. *et al.* Characteristics and acquisition of human herpesvirus (HHV)-7 infections in relation to infection with HHV-6. *J. Infect. Dis.* **193**, 1063–1069 (2006). doi: 10.1086/503434
49. Hall, C. B. *et al.* Congenital infections with human herpesvirus 6 (HHV6) and human herpesvirus 7 (HHV7). *J. Pediatr.* **145**, 472–477 (2004). doi: 10.1016/j.jpeds.2004.06.017
50. Handous, I. *et al.* Co-infections of human herpesviruses (CMV, HHV-6, HHV-7 and EBV) in non-transplant acute leukemia patients undergoing chemotherapy. *Viol. J.* (2020) doi:10.1186/s12985-020-01302-4.
51. Harkins, L. E. *et al.* Detection of human cytomegalovirus in normal and neoplastic breast epithelium. *Herpesviridae* (2010) doi:10.1186/2042-4280-1-8.
52. Holmberg, K. V. & Hoffman, M. P. Anatomy, biogenesis and regeneration of salivary glands. *Monographs in Oral Science* (2014) doi:10.1159/000358776.
53. Honjo, K. *et al.* Immunohistochemical expression profiles of mucin antigens in salivary gland mucoepidermoid carcinoma: MUC4- and MUC6-negative expression predicts a shortened survival in the early postoperative phase. *Histol. Histopathol.* (2018) doi:10.14670/HH-11-913.
54. International Committee on Taxonomy of Viruses. Master Species List 2019. *ICTV* (2019). Disponivel em: <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy>>
55. Jain, S., Hasan, S., Vyas, N., Shah, N. & Dalal, S. Pleomorphic Adenoma of the Parotid Gland: Report of a Case With Review of Literature. *Ethiop. J. Health Sci.* (2015) doi:10.4314/ejhs.v25i2.13.
56. Jayaraj, G., Sherlin, H., Ramani, P., Premkumar, P. & Anuja, N. Cytomegalovirus and Mucoepidermoid carcinoma: A possible causal relationship? A pilot study. *J. Oral Maxillofac. Pathol.* (2015) doi:10.4103/0973-029X.174618.
57. Jeffers, L. & Webster-Cyriaque, J. Y. Viruses and salivary gland disease (SGD): lessons from HIV SGD. *Advances in dental research* (2011) doi:10.1177/0022034510396882.
58. Jones, A. V., Craig, G. T., Speight, P. M. & Franklin, C. D. The range and demographics of salivary gland tumours diagnosed in a UK population. *Oral Oncol.* (2008) doi:10.1016/j.oraloncology.2007.05.010.
59. Junior, C. F. S. *et al.* Epidemiological profile of salivary gland lesions diagnosed in a higher education institution: An observational and retrospective study of 381 cases. *Acta Sci. - Heal. Sci.* **42**, 1–5 (2020). doi: 10.4025/actascihealthsci.v42i1.51032

60. Junqueira Oliveira, L. *et al.* Tratamento de adenoma pleomórfico em palato: Relato de 2 casos e revisão de literatura. *Rev. Port. Estomatol. Med. Dent. e Cir. Maxilofac.* (2016) doi:10.1016/j.rpemd.2015.12.005.
61. Kenneson, A. & Cannon, M. J. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Reviews in Medical Virology* (2007) doi:10.1002/rmv.535.
62. Kessler, A. T. & Bhatt, A. A. Review of the Major and Minor Salivary Glands, Part 1: Anatomy, Infectious, and Inflammatory Processes. *J. Clin. Imaging Sci.* (2018) doi:10.4103/jcis.jcis\_45\_18.
63. King, O. & Al Khalili, Y. *Herpes Virus Type 6*. *StatPearls* (2019). PMID: 31082042
64. Knipe, D. M. & Cliffe, A. Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection. *Nature Reviews Microbiology* (2008) doi:10.1038/nrmicro1794.
65. Krummenacher, C., Carfí, A., Eisenberg, R. J. & Cohen, G. H. Entry of herpesviruses into cells: The enigma variations. *Adv. Exp. Med. Biol.* (2013) doi:10.1007/978-1-4614-7651-1\_10.
66. Kumata, R., Ito, J. & Sato, K. Inherited chromosomally integrated HHV-6 possibly modulates human gene expression. *Virus Genes* **56**, 386–389 (2020). doi: 10.1007/s11262-020-01745-5
67. Lan, K. & Luo, M. H. Herpesviruses: epidemiology, pathogenesis, and interventions. *Virologica Sinica* vol. 32 347–348 (2017). doi: 10.1007/s12250-017-4108-2
68. Lanphear, B. P., Hall, C. B., Black, J. & Auinger, P. Risk factors for the early acquisition of human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 infections in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **17**, 792–795 (1998). doi: 10.1097/00006454-199809000-00008
69. Lepiller, Q., Tripathy, M. K., Di Martino, V., Kantelip, B. & Herbein, G. Increased HCMV seroprevalence in patients with hepatocellular carcinoma. *Viol. J.* (2011) doi:10.1186/1743-422X-8-485.
70. Licitra, L. *et al.* Major and minor salivary glands tumours. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (2003) doi:10.1016/S1040-8428(02)00005-7.
71. Lisco, A. *et al.* Viral Interactions in Human Lymphoid Tissue: Human Herpesvirus 7 Suppresses the Replication of CCR5-Tropic Human Immunodeficiency Virus Type 1 via CD4 Modulation. *J. Virol.* **81**, 708–717 (2007). Doi: 10.1128/jvi.01367-06
72. Liu, F. & Zhou, Z. H. Comparative virion structures of human herpesviruses. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis* 27–43 (2007) doi:10.1017/CBO9780511545313.004.
73. Lobato-Silva, D. de F. Citomegalovírus: epidemiologia baseada em dados de soroprevalência. *Rev. Pan-Amazônica Saúde* **7**, 213–219 (2016). doi: 10.5123/s2176-62232016000500024
74. Lönn, S. *et al.* Mobile phone use and risk of parotid gland tumor. *Am. J. Epidemiol.* (2006) doi:10.1093/aje/kwj242.

75. Lopes, A. de O. Prevalência das infecções causadas por herpesvírus humanos em portadores do hiv através de diagnóstico diferencial. (Instituto Oswaldo Cruz, 2016). Master dissertation in Biologia Parasitária.
76. Louten, J. Chapter 9 - Viruses and Cancer. in *Essential Human Virology* (2016). ISBN: 978-0-12-800947-5
77. Magalhães, I. M. *et al.* Detection of human herpesvirus 6 and 7 DNA in saliva from healthy adults from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **105**, 925–927 (2010). doi: 10.1590/S0074-02762010000700015
78. Magalhães, I. M. *et al.* Detection of human herpesvirus 6 and 7 DNA in saliva from healthy adults from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **105**, 925–927 (2010). doi: 10.1590/S0074-02762010000700015
79. Maldonado, Y. A. Less Common Viral Infections. in *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant* 905–916 (Elsevier Inc., 2011). doi:10.1016/B978-1-4160-6400-8.00030-4.
80. Malheiros, J. Desenvolvimento das metodologias de RT-qPCR e microarranjo líquido multiplex para quantificação dos vírus que compõem a vacina tríplice viral. *Instituto de tecnologia em imunobiológicos Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos*. (2017). Master Dissertation.
81. Mana, H. Al *et al.* The current status of cytomegalovirus (CMV) prevalence in the MENA region: A systematic review. *Pathogens* (2019) doi:10.3390/pathogens8040213.
82. Marin, L. J. *et al.* Prevalence and clinical aspects of CMV congenital Infection in a low-income population. *Viol. J.* **13**, (2016). doi: 10.1186/s12985-016-0604-5
83. Martí-Carreras, J. & Maes, P. Human cytomegalovirus genomics and transcriptomics through the lens of next-generation sequencing: revision and future challenges. *Virus Genes* vol. 55 138–164 (2019). doi: <https://doi.org/10.1007/s11262-018-1627-3>
84. Martinelli, M. *et al.* Simian virus 40 sequences and expression of the viral large T antigen oncoprotein in human pleomorphic adenomas of parotid glands. *Am. J. Pathol.* (2002) doi:10.1016/S0002-9440(10)64389-1.
85. Melnick, M., *et al.* Human cytomegalovirus and mucoepidermoid carcinoma of salivary glands: Cell-specific localization of active viral and oncogenic signaling proteins is confirmatory of a causal relationship. *Exp. Mol. Pathol.* (2012) doi:10.1016/j.yexmp.2011.10.011.
86. Naclér, C. S., Geisler, J. & Vetvik, K. The emerging role of human cytomegalovirus infection in human carcinogenesis: A review of current evidence and potential therapeutic implications. *Oncotarget* (2019) doi:10.18632/oncotarget.27016.
87. Noel, L. *et al.* Epidemiology of salivary gland tumours in an Eastern Caribbean nation: A retrospective study. *Ann. Med. Surg.* (2018) doi:10.1016/j.amsu.2018.10.039.

88. Ongrádi, J., *et al.* Roseolovirus-associated encephalitis in immunocompetent and immunocompromised individuals. *Journal of NeuroVirology* (2017) doi:10.1007/s13365-016-0473-0.
89. Paludan, S. R., Bowie, A. G., Horan, K. A. & Fitzgerald, K. A. Recognition of herpesviruses by the innate immune system. *Nature Reviews Immunology* (2011) doi:10.1038/nri2937.
90. Pantry, S. N. & Medveczky, P. G. Latency, integration, and reactivation of human herpesvirus-6. *Viruses* vol. 9 (2017). doi: 10.3390/v9070194
91. PDQ Adult Treatment Editorial Board. *Salivary Gland Cancer Treatment (Adult) (PDQ®): Patient Version. PDQ Cancer Information Summaries* (2002). Available in: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26389192>>
92. Peel, R. L. & Seethala, R. R. Pathology of salivary gland disease. in *Salivary Gland Disorders* (2007). doi:10.1007/978-3-540-47072-4\_3.
93. Peraza, A., Gómez, R., Beltran, J. & Amarista, F. J. Mucoepidermoid carcinoma. An update and review of the literature. *Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery* (2020) doi:10.1016/j.jormas.2020.06.003.
94. Pires, F. R., Pringle, G. A., de Almeida, O. P. & Chen, S. Y. Intra-oral minor salivary gland tumors: A clinicopathological study of 546 cases. *Oral Oncol.* (2007) doi:10.1016/j.oraloncology.2006.04.008.
95. Price III, R. L. The Role of Cytomegalovirus in Glioblastoma and Rhabdomyosarcoma. *ProQuest Diss. Theses* (2012). doi: 9781267682383
96. Rahayuningtyas, E. D. & Setiadhi, R. VIRUS AS A CAUSE OF SALIVARY GLAND DISEASES. *ODONTO Dent. J.* (2019) doi:10.30659/odj.6.1.37-42.
97. Raposo, J. V. *et al.* Multiplex qPCR facilitates identification of betaherpesviruses in patients with acute liver failure of unknown etiology. *BMC Infect. Dis.* **19**, 773 (2019). doi:10.1186/s12879-019-4309-4.
98. Razonable, R. R. Herpes Simplex Viruses 1 and 2, Varicella Zoster Virus, and Human Herpes Viruses 6, 7, and 8 in Transplant Recipients. in *Principles and Practice of Transplant Infectious Diseases* 667–677 (Springer New York, 2019). doi:10.1007/978-1-4939-9034-4\_39.
99. Reinheimer, A., Vieira, D. S. C., Cordeiro, M. M. R. & Rivero, E. R. C. Retrospective study of 124 cases of salivary gland tumors and literature review. *J. Clin. Exp. Dent.* (2019) doi:10.4317/JCED.55685.
100. Revello, M. G. *et al.* Role of prenatal diagnosis and counseling in the management of 735 pregnancies complicated by primary human cytomegalovirus infection: A 20-year experience. *J. Clin. Virol.* (2011) doi:10.1016/j.jcv.2010.12.012.
101. Roizman, B. & Campadelli-Fiume, G. Alphaherpes viral genes and their functions. in *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis* 70–92 (Cambridge University Press, 2007). doi:10.1017/CBO9780511545313.007.

102. Sada, E. *et al.* Detection of human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 in the submandibular gland, parotid gland, and lip salivary gland by PCR. *J. Clin. Microbiol.* (1996) doi:10.1128/jcm.34.9.2320-2321.1996.
103. Sada, E. *et al.* Detection of human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 in the submandibular gland, parotid gland, and lip salivary gland by PCR. *J. Clin. Microbiol.* (1996) doi:10.1128/jcm.34.9.2320-2321.1996.
104. Samanta, M. *et al.* High prevalence of human cytomegalovirus in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic carcinoma. *J. Urol.* (2003) doi:10.1097/01.ju.0000080263.46164.97.
105. Sarmiento, D. J. de S., Morais, M. de L. S. de A., Costa, A. de L. L. & Silveira, É. J. D. da. Minor intraoral salivary gland tumors: a clinical-pathological study. *Einstein (Sao Paulo)*. (2016) doi:10.1590/S1679-45082016AO3749.
106. Schmutzhard, J., Riedel, H. M., Wirgart, B. Z. & Grillner, L. Detection of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2 and varicella-zoster virus in skin lesions. Comparison of real-time PCR, nested PCR and virus isolation. *J. Clin. Virol.* (2004) doi:10.1016/S1386-6532(03)00113-6.
107. Sciubba, J. J. Oral mucosal diseases in the office setting Part I: Aphthous stomatitis and herpes simplex infections. *General Dentistry* vol. 55 347–354 (2007). PMID: 17682646
108. Seifert, G., Brocheriou, C., Cardesa, A. & Eveson, J. W. WHO International Histological Classification of Tumours Tentative Histological Classification of Salivary Gland Tumours. *Pathol. Res. Pract.* (1990) doi:10.1016/S0344-0338(11)80220-7.
109. Sen, P. & Barton, S. E. Genital herpes and its management. *British Medical Journal* (2007) doi:10.1136/bmj.39189.504306.55.
110. Senthilkumar, B. & Nazargi Mahabob, M. Mucocele: An unusual presentation of the minor salivary gland lesion. *J. Pharm. Bioallied Sci.* (2012) doi:10.4103/0975-7406.100265.
111. Serra, F. C. *et al.* Soroprevalência de citomegalovírus em gestantes brasileiras de classe socioeconômica favorecida. *DST j. bras. doenças sex. transm* (2009). ISSN: 0103-4065
112. Shanehsazzadeh, M. *et al.* Epidemiology of herpes human virus 6 and 7 infections in salivary gland neoplasms in isfahan, iran. *Med. Arch. (Sarajevo, Bosnia Herzegovina)* **68**, 276–278 (2014). doi: 10.5455/medarh.2014.68.276-278
113. Speight, P. M. & Barrett, A. W. Salivary gland tumours. *Oral Dis.* (2002) doi:10.1034/j.1601-0825.2002.02870.x.
114. Spiro, R. H., Huvos, A. G. & Strong, E. W. Cancer of the parotid gland. A clinicopathologic study of 288 primary cases. *Am. J. Surg.* (1975) doi:10.1016/0002-9610(75)90483-3.
115. Strick, L. B. & Wald, A. Diagnostics for herpes simplex virus: Is PCR the new gold standard? *Molecular Diagnosis and Therapy* (2006) doi:10.1007/BF03256439.

116. Sun, E. C., Curtis, R., Melbye, M. & Goedert, J. J. Salivary gland cancer in the United States. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* (1999). PMID: 10613342. ISSN: 10559965
117. Taher, C. *et al.* High prevalence of human cytomegalovirus in brain metastases of patients with primary breast and colorectal cancers. *Transl. Oncol.* (2014) doi:10.1016/j.tranon.2014.09.008.
118. Teng, W. Q. *et al.* Distribution of 37 human papillomavirus types in parotid gland tumor tissues. *Oncol. Lett.* (2014) doi:10.3892/ol.2013.1770.
119. Thomas, D., Nair, V. & Thomas, S. Pleomorphic adenoma: An unusual presentation on upper lip - A case report. *J. Indian Acad. Oral Med. Radiol.* (2017) doi:10.4103/jiaomr.jiaomr\_18\_17.
120. Tian, Z., Li, L., Wang, L., Hu, Y. & Li, J. Salivary gland neoplasms in oral and maxillofacial regions: a 23-year retrospective study of 6982 cases in an eastern Chinese population. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **39**, 235–242 (2010). doi: 10.1016/j.ijom.2009.10.016
121. To, V. S. *et al.*, Review of Salivary Gland Neoplasms. *ISRN Otolaryngol.* **2012**, 1–6 (2012). doi: 10.5402/2012/872982
122. Torres, L. & Tang, Q. Immediate-Early (IE) gene regulation of cytomegalovirus: IE1- and pp71-mediated viral strategies against cellular defenses. *Virologica Sinica* vol. 29 343–352 (2014). 10.1007/s12250-014-3532-9
123. Vargas, P. A. *et al.* Salivary gland tumors in a Brazilian population: a retrospective study of 124 cases. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Sao. Paulo.* (2002) doi:10.1590/S0041-87812002000600005.
124. Vasconcelos, A. C. *et al.* Clinicopathological analysis of salivary gland tumors over a 15-year period. *Braz. Oral Res.* **30**, (2016). doi: 10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0002
125. Wang, Y. L. *et al.* Clinicopathologic study of 1176 salivary gland tumors in a Chinese population: Experience of one cancer center 1997-2007. *Acta Otolaryngol.* **132**, 879–886 (2012). doi: 10.3109/00016489.2012.662715
126. Waters, S., Lee, S., Lloyd, M., Irish, A. & Price, P. The detection of CMV in saliva can mark a systemic infection with CMV in renal transplant recipients. *Int. J. Mol. Sci.* (2019) doi:10.3390/ijms20205230.
127. Waters, S., Lee, S., Lloyd, M., Irish, A. & Price, P. The detection of CMV in saliva can mark a systemic infection with CMV in renal transplant recipients. *Int. J. Mol. Sci.* (2019) doi:10.3390/ijms20205230.
128. Weidner-Glunde, M., Kruminis-Kaszkiel, E. & Savanagouder, M. Herpesviral latency—common themes. *Pathogens* **9**, (2020). 10.3390/pathogens9020125
129. Whitley, R. & Baines, J. Clinical management of herpes simplex virus infections: Past, present, and future [version 1; peer review: 2 approved]. *F1000Research* vol. 7 (2018). doi: 10.12688/F1000RESEARCH.16157.1

130. Wofford, A. S., McCusker, I., Green, J. C., Vensko, T. A. & Pellett, P. E. Betaherpesvirus assembly and egress: Recent advances illuminate the path. in *Advances in Virus Research* vol. 108 337–392 (2020). doi: 10.1016/bs.aivir.2020.09.003
131. Wołańciewicz, M., Becht, R., Grywalska, E. & Niedźwiedzka-Rystwej, P. Herpesviruses in head and neck cancers. *Viruses* vol. 12 (2020). doi: 10.3390/v12020172
132. Xu, W. *et al.* Prognostic factors of palatal mucoepidermoid carcinoma: A retrospective analysis based on a double-center study. *Sci. Rep.* (2017) doi:10.1038/srep43907.
133. Yamanishi, K. *et al.* Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet* **331**, 1065–1067 (1988). doi: 10.1016/S0140-6736(88)91893-4
134. Yen, T. L. *et al.* Role of cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, and human herpes virus-8 in benign lymphoepithelial cysts of the parotid gland. *Laryngoscope* (2004) doi:10.1097/00005537-200408000-00034.
135. Yih, W. Y., Kratochvil, F. J. & Stewart, J. C. B. Intraoral minor salivary gland neoplasms: Review of 213 cases. *J. Oral Maxillofac. Surg.* (2005) doi:10.1016/j.joms.2005.02.021.
136. Zini, M. *et al.* Carcinoma mucoepidermoide em palato: relato de caso Palatal mucoepidermoidal carcinoma: a case report. *Rev. Cir. Traumatol* (2010). doi: 1808-5210



## ANEXOS

### Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética



USP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DA  
UNIVERSIDADE DE SÃO  
PAULO - FOUSP



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Análise de vírus oncogênicos em neoplasias de glândula salivar

**Pesquisador:** Paulo Henrique Braz da Silva

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 23247619.9.0000.0075

**Instituição Proponente:** Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.683.851

##### Apresentação do Projeto:

Tumores em glândulas salivares são considerados como casos raros e patologias pertencentes a um grupo de doenças que causam lesões heterogênicas com quadro clínico complexo e dinâmica biológica incomum. Os fatores de risco que causam estes tumores ainda são desconhecidos, mas alguns estudos demonstram que hábitos alimentares saudáveis contribuem para a prevenção do desenvolvimento de tumores em glândulas

salivares. Análises em salivas têm detectado vírus de DNA que infectam humanos como o Papilomavírus Humano (HPV), os Herpesvírus Humanos como o Herpesvírus Humano tipos 4,5,6 e 7 e o Poliomavírus nos quais estão associados a uma série de tumores. Mesmo com identificação positiva destes vírus em amostras de saliva em pacientes com tumor em glândula salivar, ainda não existem estudos com resultados consistentes destes

vírus na etiologia dos tumores em glândulas salivares. Os objetivos deste projeto de pesquisa são: i) Estimar a prevalência do HPV, dos Herpesvírus e do BK em amostras de pacientes com tumor de glândulas salivares por Qpcr; ii) Avaliar o perfil epidemiológico dos pacientes com tumor de glândulas salivares e infectados pelo HPV e/ou HHVs e/ou BK; iii) Investigar através da detecção do replicativo intermediário a replicação e a persistência do HPV e HHV em tumores de glândulas salivares; iv) Realizar análise filogenética para identificar quais subtipos virais do HPV, HHV e

BK são encontrados nestes tipos de amostras. Para o estudo, será selecionado um total de 80 amostras, cujas características são: i) Lesões não neoplásicas de glândula salivar-sialoadenite

**Endereço:** Av Prof Lineu Prestes 2227 - 1º andar, sala 02 da administração

**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 05.508-000

**UF:** SP **Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7960 **E-mail:** ceplo@usp.br



Continuação do Parecer: 3.683.851

crônica (30); ii) Neoplasia benigna – adenoma pleomórfico (30); iii) Neoplasia maligna – carcinoma mucocelidomóide (20). Para avaliar a expressão destes vírus, será feita a extração do material genético em parafina, extração dos DNAs virais, reação em PCR em tempo real, PCR convencional e Sequenciamento Sanger para caracterização molecular. Para análise de dados serão utilizados os testes: qui-quadrado para as variáveis categóricas, o teste t de Student para as variáveis quantitativas com distribuição normal e testes não-paramétricos adequados para aquelas sem distribuição normal. Para esta finalidade, será utilizado o pacote estatístico SPSS, considerando um valor significativo quando  $p < 0,05$ .

#### **Objetivo da Pesquisa:**

##### **Objetivo Primário:**

Investigar a infecção ativa Papilomavírus Humano (HPV), dos Herpesvírus Humano (HHV) e Poliomavírus (BK e JC) em amostras de tumor em glândulas salivares.

##### **Objetivo Secundário:**

Estimar a prevalência do HPV, dos herpesvírus e poliomavírus em amostras de pacientes com tumor de glândulas salivares por qPCR;

Avaliar o perfil epidemiológico dos pacientes com tumor de glândulas salivares e infectados pelo HPV e/ou herpesvírus e/ou poliomavírus

Investigar através da detecção do replicativo intermediário a replicação e a persistência do HPV, HHV e BK/JC em tumores de glândulas salivares;

Realizar análise filogenética para identificar quais subtipos virais do HPV, HHV e BK/JC são encontrados nestes tipos de amostras.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

##### **Riscos:**

O projeto apresenta riscos mínimos, uma vez que utiliza amostras parafinadas de arquivo do Serviço de Patologia Cirúrgica.

##### **Benefícios:**

Não apresenta benefícios diretos aos participantes.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa contribuirá para o avanço do conhecimento sobre o perfil epidemiológico do HPV, HHV e BK em espécimes de tumores em glândulas salivares e identificar os tipos mais comuns destes vírus.

**Endereço:** Av Prof Lineu Prestes 2227 - 1º andar, sala 02 da administração  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 05.508-000  
**UF:** SP **Município:** SÃO PAULO  
**Telefone:** (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7960 **E-mail:** ceplo@usp.br



Continuação do Parecer: 3.683.851

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram apresentados:

Projeto detalhado, Autorização do serviço de Patologia, Autorização do Laboratório da Fiocruz, Autorização do Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Folha de Rosto

**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](http://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_1435062.pdf	11/10/2019 05:40:42		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_glsalivar_virus.pdf	11/10/2019 05:29:33	Paulo Henrique Braz da Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_IMT.pdf	09/10/2019 05:51:53	Paulo Henrique Braz da Silva	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	autorizacao_Patologia.pdf	08/10/2019 14:04:13	Paulo Henrique Braz da Silva	Aceito
Folha de Rosto	folharosto.pdf	08/10/2019 06:23:43	Paulo Henrique Braz da Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_FIOCRUZ.pdf	20/09/2019 10:06:54	Paulo Henrique Braz da Silva	Aceito

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227 - 1º andar, sala 02 da administração  
Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-000  
UF: SP Município: SÃO PAULO  
Telefons: (11)3091-7960 Fax: (11)3091-7960 E-mail: [cepfo@usp.br](mailto:cepfo@usp.br)



USP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DA  
UNIVERSIDADE DE SÃO  
PAULO - FOUSP



Continuação do Parecer: 3.683.851

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 05 de Novembro de 2019

---

**Assinado por:**  
Alyne Simões Gonçalves  
(Coordenador(a))

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)3091-7980 Fax: (11)3091-7980 E-mail: cepfo@usp.br

Página 04 de 04



