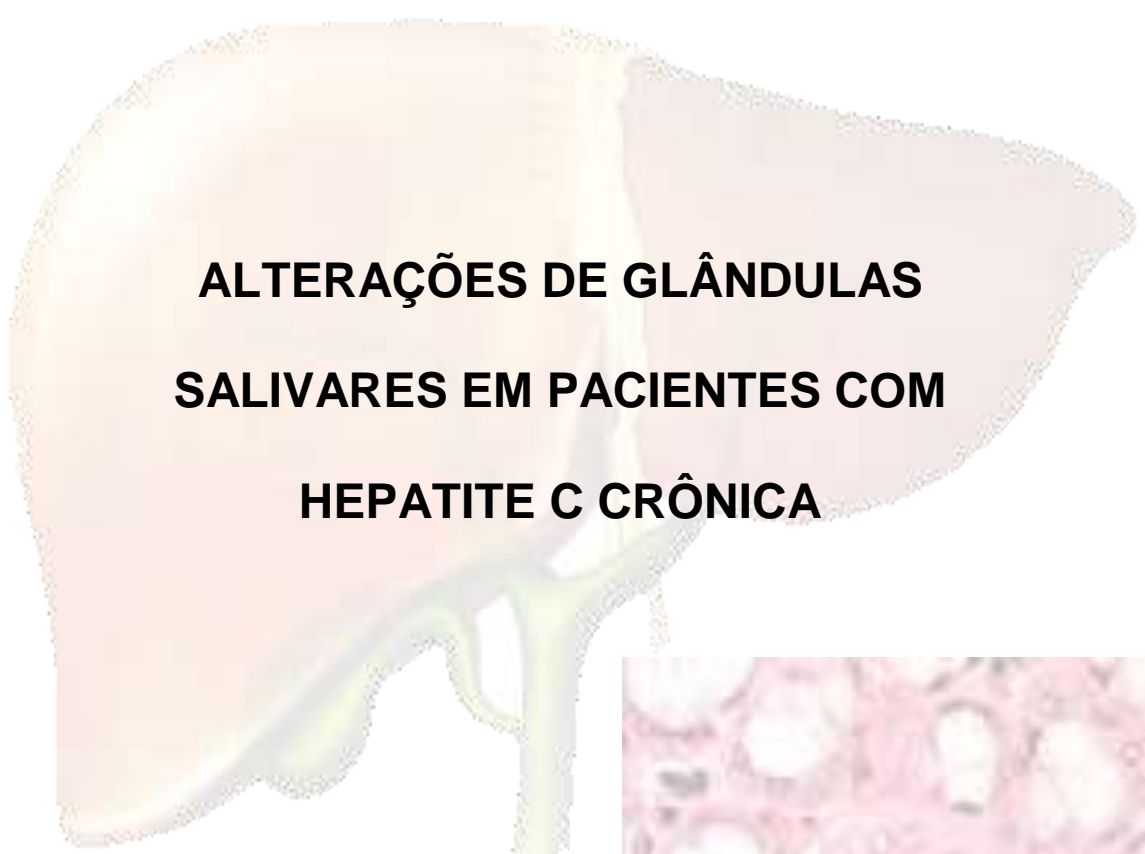
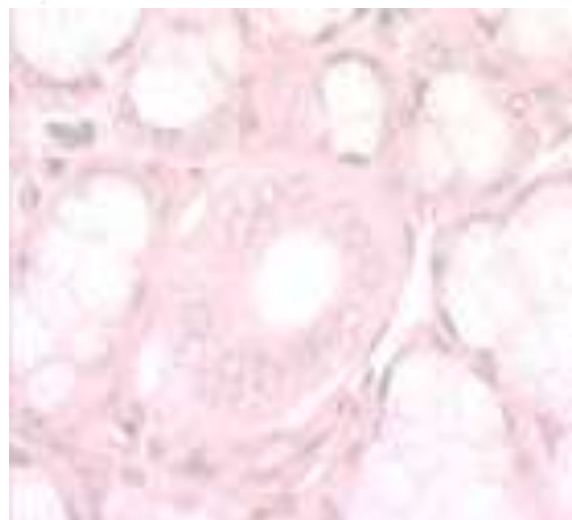


SORAYA DE MATTOS CAMARGO GROSSMANN ALMEIDA



**ALTERAÇÕES DE GLÂNDULAS
SALIVARES EM PACIENTES COM
HEPATITE C CRÔNICA**



Belo Horizonte/MG

Faculdade de Odontologia/Universidade Federal de Minas Gerais

2010

SORAYA DE MATTOS CAMARGO GROSSMANN ALMEIDA

**ALTERAÇÕES DE GLÂNDULAS
SALIVARES EM PACIENTES COM
HEPATITE C CRÔNICA**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Odontologia – área de concentração em Patologia Bucal

Orientadora: Profa. Dra. Maria Auxiliadora Vieira do Carmo

Co-orientadora: Profa. Dra. Rosângela Teixeira

Co-orientador: Prof. Dr. Guilherme Corrêa de Oliveira

Belo Horizonte/MG

Faculdade de Odontologia/Universidade Federal de Minas Gerais

2010

Dedico esse trabalho as pessoas mais importantes da minha vida:

Minha mãe, **Jandira**

Meu pai, **Rodolfo**

Meus irmãos, **Sophia e Rodrigo**

Meu marido, **Rinaldo**

E minhas filhas, **Luiza e Júlia**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a **DEUS**, por ter iluminado meu caminho e me possibilitado enxergar as pessoas especiais que nele surgiram ao longo dessa caminhada.

A meus pais, **Rodolfo** e **Jandira**, meu eterno agradecimento. Obrigada pelo apoio, pelos conselhos, e principalmente pelo amor incondicional!

A meu querido esposo, **Rinaldo**, por ser tão importante na minha vida. Seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor, ajudaram-me a concretizar esse trabalho. Obrigada por ter feito do meu sonho o nosso sonho!

Às minhas filhas **Luiza** e **Júlia**, que foram fundamentais nessa batalha, pois me fizeram esquecer as dificuldades do caminho com a alegria inocente de criança. Vocês me deram o título mais inesquecível da minha vida: o título de MÃE!

A meus irmãos, *Sophia* e *Rodrigo*, e a meus sobrinhos *Thiago*, *Felipe*, *John*, *Isacc* e *Isabela*, pois completam meus dias. Vocês merecem meu agradecimento especial!

A meus tios, tias, primos e primas, especialmente *tia Meirinha*, *tia Rachel* e *Carla*, que sempre estiveram a meu lado, mesmo, algumas vezes, distantes de mim. Obrigada pela força!

Agradeço também a meus cunhados *Ricardo* e *Daniel*, às minhas cunhadas *Elizabeth* e *Cyntia*, e a meus sogros, *Lúcio* e *Ana Maria*, pelo incentivo e apoio. Obrigada também pelo carinho!

Às minhas amigas de sempre, *Luciana*, *Renata* e *Tereza*, obrigada pela amizade fiel!

À Prof^a *Dorinha* por participar tanto tempo de minha formação profissional, e ter sempre me mostrado que um grande pesquisador nunca esquece de valorizar o ser humano antes de qualquer resultado a ser obtido. Em alguns momentos, foi minha conselheira, confidente, mãe e amiga. Obrigada por estar sempre a meu lado!

À Prof^a *Rosângela* agradeço, enormemente, por sua disponibilidade, disposição e conhecimento. Você foi mais que uma co-orientadora, uma referência profissional e pessoal para mim. Obrigada por sempre acreditar em meu trabalho!

Ao Prof. *Guilherme* que abriu prontamente as portas para mim. Você foi um grande facilitador desse trabalho. Obrigada pela confiança!

A todos os pacientes do Ambulatório de Hepatites Virais que participaram espontaneamente deste trabalho, sem os quais essa tese nunca se concretizaria. Deram-me mais que resultados para análises, proporcionaram-me mais que a busca de conhecimento técnico e científico, ensinaram-me grandes LIÇÕES DE VIDA! Vocês merecem meu eterno agradecimento!

A meus amigos de doutorado, pelos momentos divididos juntos, especialmente os da área de Estomatologia e Patologia Bucal. Um agradecimento especial para *Mariela*, minha amiga de todas as horas, uma quase irmã. Você dividiu comigo minhas angústias e alegrias, ouviu minhas bobagens e tornou mais leve meu trabalho. É sempre bom poder contar com você!

Aos Profs. *Paulo Eduardo Alencar de Souza* e *Tarcília Aparecida da Silva* agradeço extremamente pelas substanciais colaborações em minha qualificação, que contribuíram de forma consistente nesse trabalho. Obrigada pela grande contribuição!

A todos os alunos, professores e funcionários do Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia, especialmente aos professores *Ricardo Alves Mesquita*, *Maria*

Cássia Ferreira de Aguiar, João Batista e Ricardo Santiago Gómez com os quais muito aprendi durante o doutorado. Vocês também são referenciais para mim!

Às funcionárias do Colegiado de Pós-graduação, especialmente à *Laís*, à *Zuleica* e à *Beth*, pela simpatia e gentileza. Obrigada pela ajuda!

Aos médicos do Ambulatório de Hepatites Virais e aos alunos de pós-graduação do Instituto Renné Rachou-FIOCRUZ e Faculdade de Odontologia da UFMG que me ajudaram neste trabalho. Meus agradecimentos especiais para *Frederico Omar Gleber-Netto, Flávio Marcos Gomes Araújo, e Filipe Maia Araújo*, que cooperaram ativamente neste trabalho e nunca negaram ajuda quando precisei. Obrigada de verdade!

Enfim, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização do meu DOUTORADO. Afinal, ninguém vence sozinho...

OBRIGADA A TODOS!

Uma criança pronta para nascer, perguntou a Deus:

- Senhor, dizem que descerei para a Terra amanhã, mas como vou viver lá, sendo assim, tão pequena e indefesa?

E Deus falou:

- Entre muitos anjos, eu escolhi um muito especial para você. Esse Anjo está lhe esperando e tomará conta de você.

A criança, curiosa, continuou:

- Mas, me diga uma coisa, Senhor, aqui no céu eu não faço nada, a não ser cantar e sorrir, o que é suficiente para que eu seja feliz... Como será lá na Terra?

E Deus, pacientemente falou:

- Seu Anjo irá cantar e sorrir para você. A cada dia, a cada instante, você sentirá o amor do seu Anjo e será feliz.

A criança queria saber mais e perguntou:

- E como vou entender, quando falarem comigo, se eu não conheço a língua que as pessoas da Terra falam?

E Deus respondeu:

- Com muita paciência e carinho, seu Anjo vai lhe ensinar a falar.

A criança quis saber mais:

- E o que vou fazer quando eu quiser falar contigo, Senhor?

Deus disse:

- Seu Anjo vai juntar suas mãos e lhe ensinar a orar.

A criança, preocupada, perguntou também:

- Eu ouvi dizer que na Terra existem homens maus. Quem irá me proteger dos perigos?

Deus, então, respondeu:

- Seu Anjo irá defender você, mesmo arriscando sua própria vida.

A criança queria saber muito mais e falou:

- Então serei sempre triste porque não o verei mais, Senhor!

Deus disse:

- Seu Anjo sempre irá lhe falar de Mim. Vai lhe ensinar a maneira de vir a Mim. E Eu, sempre estarei dentro de você!

Nesse momento, havia muita paz no Céu, mas, as vozes da Terra já começavam a ser ouvidas.

A criança, apressada, pediu carinhosamente a Deus:

- Oh, Deus! Se este é o momento de ir para a Terra, por favor, me diga: qual o nome do meu Anjo?

E Deus respondeu:

- Você chamará o seu Anjo de **MÃE!**

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

Anti-HCV	- Anticorpos contra o vírus da hepatite C
AHV	- Ambulatório de Hepatites Virais
c DNA	- Fita de DNA complementar
CHC	- Hepatite C crônica do inglês “chronic hepatitis C”
COEP	- Comitê de Ética em Pesquisa
DEPE	- Diretoria de Ensino e Pesquisa
DNA	- Ácido desoxiribonucléico do inglês “desoxiribonucleic acid”
EVA	- Escala Visual Analógica
FO-UFMG	- Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais
FSE	- Fluxo salivar estimulado
FSNE	- Fluxo salivar não-estimulado
HE	- Hematoxilina e eosina
HBV	- vírus da hepatite B do inglês “ hepatitis B virus”
HCV	- vírus da hepatite C do inglês “ hepatitis C virus”
HCV RNA	- RNA do vírus da hepatite C
HC-UFMG	- Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais
HIV	- vírus da imunodeficiência humana do inglês “human immunodeficiency virus”
HTLV	- vírus que infecta células T humanas do inglês “Human T lymphotropic virus”
IAG	- Instituto Alfa de Gastroenterologia

MEH	- Manifestação Extra-Hepática
nested-RT-PCR	- dupla transcrição reversa da reação em cadeia de polimerase
NIH	- Instituto Nacional de Saúde do inglês "National Institute of Health"
PCR	- reação em cadeia de polimerase do inglês "polymerase chain reaction"
RNA	- Ácido ribonucléico do inglês "ribonucleic acid"
RT-PCR	- transcrição reversa da reação em cadeia de polimerase do inglês "reverse transcription-polymerase chain reaction"
SS	- Síndrome de Sjögren
UFMG	- Universidade Federal de Minas Gerais

RESUMO

Introdução. O sialotropismo do HCV tem sido relacionado com a patogênese de manifestações extra-hepáticas, como xerostomia e sialoadenite, em pacientes com hepatite C crônica. O objetivo do presente estudo foi investigar a prevalência do HCV RNA na saliva e em glândulas salivares e suas possíveis associações com xerostomia, hipossalivação e sialoadenite em pacientes com hepatite C crônica.

Metodologia. 136 pacientes com diagnóstico confirmado de hepatite C crônica (anti-HCV e HCV RNA PCR positivos) foram incluídos neste estudo transversal, sendo critérios de exclusão a co-infecção pelo HIV e/ou HBV e pacientes em tratamento para a hepatite C crônica. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG. HCV RNA foi investigado por meio de *nested*-RT-PCR em amostras de saliva de todos os pacientes e em amostras de glândulas salivares de 65 pacientes. A presença de xerostomia foi avaliada, e os fluxos salivares não estimulado (FSNE) e estimulado (FSE) foram mensurados. FSNE e FSE $\leq 0,1$ ml/min e $\leq 0,7$ ml/min respectivamente, foram considerados como hipossalivação. Sintomas e sinais clínicos de sialoadenite e a presença histológica de infiltrado inflamatório na glândula salivar de lábio inferior foram também avaliados. Exames intra-buciais foram realizados em todos os pacientes. As possíveis associações entre as diferentes variáveis, incluindo dados demográficos e história médica dos pacientes, foram investigadas pelas análises uni e multivariada, usando os programas Stata 10.0 e EPIINFO 3.4.3.

Resultados. A amostra foi composta por 71 (52,2%) homens e 65 (47,8%) mulheres, com média de idade de 58,1 anos. Xerostomia foi relatada em 48/136 (35,3%) pacientes. Hipossalivação foi observada em 16 (11,8%) amostras de FSNE e em 21 (15,4%) de FSE ($p=NS$). HCV RNA foi detectado nas amostras de saliva de 53/136 (39,0%) pacientes e nas glândulas salivares de 12/65 (18,5%) pacientes. Seis (9,2%) dos 65 pacientes apresentaram concomitantemente o HCV RNA na saliva e em glândulas salivares. Em 11/136 (8,0%) pacientes xerostomia e hipossalivação foram

observadas simultaneamente, e HCV RNA foi detectado na saliva e nas glândulas salivares de 2/11 (18,2%) pacientes. Embora em nenhum paciente sinais e sintomas clínicos de sialoadenite estivessem presentes, em 31/65 (47,7%) casos o diagnóstico histológico de sialoadenite pôde ser realizado. HCV RNA foi detectado em amostras de saliva de 12/31 (38,7%) e em glândula salivar de 3/31 (9,7%) dos pacientes com sialoadenite. Alterações de mucosa bucal foram diagnosticadas em 76/136 (55,9%) pacientes. Estatisticamente não houveram associações significantes entre as variáveis estudadas.

Conclusão. Xerostomia, hipossalivação e sialoadenite são frequentes em pacientes com CHC. Entretanto, essas alterações de glândulas salivares não puderam ser associadas com a presença de HCV RNA na saliva e em glândula salivar, em discordância com o sialotropismo do HCV descrito na literatura. Nossos resultados não descartam, no entanto, a possibilidade de que as desordens de glândulas salivares em pacientes com hepatite C crônica possam ser consequência de mecanismos imune-induzidos pelo vírus. Assim, outras investigações sobre os aspectos patogênicos dessa associação se fazem necessárias.

Palavras chaves: HCV RNA; saliva; hepatite C crônica; HCV, xerostomia, glândulas salivares.

ABSTRACT

Background and aims. The sialotropism of HCV has been implicated in the pathogenesis of oral extrahepatic manifestations, as xerostomia and sialadenitis, in patients with chronic hepatitis C. The aim of this study was to investigate the prevalence of HCV RNA in saliva and salivary glands and its possible association with xerostomia, hyposalivation and sialadenitis in patients with chronic hepatitis C.

Methods. 136 patients with confirmed diagnosis of chronic hepatitis C (anti-HCV and HCV RNA PCR positive) were included in this cross sectional study, after exclusion of HIV and/or HBV coinfection, and patients under HCV treatment. The study was approved by Ethical Board of UFMG. HCV RNA was investigated by nested RT-PCR in saliva samples of all patients and in minor salivary gland of 65 patients. Xerostomia was evaluated and non-stimulated (NSSF) and stimulated (SSF) salivary flows were measured. NSSF and SSF ≤ 0.1 ml/min and ≤ 0.7 ml/min, respectively, were indicative of hyposalivation. Clinical evidence of sialadenitis and the histopathological presence of inflammatory infiltration in salivary glands were also evaluated. Oral exam were performed in all patients. The possible associations among the different variables, including demographical data and medical history, were tested by univariate and multivariate analyzes using Stata 10.0 and EPIINFO 3.4.3 software.

Results. The sample comprised 71 (52.2%) men and 65 (47.8%) women, and mean age of 58.1 years. Xerostomia was reported by 48/136 (35.3%) patients. Hyposalivation was observed in 16 (11.8%) NSSF samples and in 21 (15.4%) SSF ($p=NS$). HCV RNA was detected in saliva of 53/136 (39.0%) patients and in salivary glands of 12/65 (18.5%) patients. Six (9.2%) of 65 patients had concomitant the HCV RNA in saliva and salivary glands. In 11/136 (8.0%) patients, xerostomia and hyposalivation were observed simultaneously, and HCV RNA was detected in saliva and salivary glands in 2/11 (18.2%) patients. Although none showed clinical evidence of sialadenitis, in 31/65 (47.7%) patients histological diagnosis of sialadenitis could be made. HCV RNA was

detected in saliva samples of 12/31 (38.7%) and in salivary glands of 3/31 (9.7%) patients with sialadenitis. Oral mucosal conditions were diagnosed in 76/136 (55.9%) patients. There was not association among the studied variables.

Conclusion. Xerostomia, hyposalivation and sialadenitis are frequent in patients with CHC. However, these alterations of salivary glands could not be associated with the presence of HCV RNA in saliva or salivary glands, in disagreement with sialotropism of HCV described in the literature. However, our results do not exclude the possibility of salivary glands disorders in chronic hepatitis C patients as a consequence of immune mechanism prompted by virus. Thus, further investigations of the pathogenic aspects of this association are necessary.

Key Words: HCV RNA; saliva; chronic hepatitis C; HCV, xerostomia, salivary glands.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Hepatite C crônica	19
2.2 Alterações de glândulas salivares e hepatite C crônica	21
2.2.1 Xerostomia, Hipossalivação e Sialoadenite	22
3. OBJETIVOS	25
4. METODOLOGIA	27
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
6. RESULTADOS	39
ARTIGO 1	40
ARTIGO 2	46
ARTIGO 3	55
ARTIGO 4	74
ARTIGO 5	81
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	99
8. CONCLUSÕES	103
ANEXOS	105

A hepatite C é uma doença, na grande maioria dos casos, crônica, silenciosa, grave, com altas taxas de mortalidade e morbidade, representando a maior causa atual de transplantes hepáticos no mundo. Considerando-se, assim, a atual importância clínica da hepatite C no contexto mundial, são urgentes as investigações direcionadas a essa doença, elucidando aspectos importantes ligados à patogênese do vírus da hepatite C (HCV).

Diferentes manifestações extra-hepáticas (MEH), já bem determinadas na literatura, podem fazer parte do quadro da hepatite C crônica, e seu reconhecimento pode representar a chance de diagnóstico precoce em pacientes HCV positivos que desconhecem seu estado de portador viral. Embora alguns estudos tenham descrito diferentes manifestações bucais em pacientes com hepatite C crônica, o líquen plano e a sialoadenite têm sido consideradas, de forma mais consistente, como as principais manifestações extra-hepáticas bucais da doença.

Embora com prevalências diferentes relatadas na literatura, o HCV tem sido detectado na saliva dos pacientes com hepatite C crônica, o que poderia sugerir uma possível transmissão do HCV a partir da contaminação pela saliva, em pelo menos alguns casos. No entanto, o mecanismo pelo qual o vírus infecta a saliva e seu significado clínico permanecem ainda desconhecidos.

A detecção do HCV em tecidos epiteliais de pacientes com líquen plano bucal e em tecidos de glândulas salivares descrita na literatura, sugere que tecidos extra-hepáticos possam ser reservatórios do HCV podendo acarretar efeito na transmissão e morbidade da doença. Sobretudo, tem-se sugerido que o HCV teria um triplo tropismo (hepatotropismo, linfotropismo e sialotropismo), embora o mecanismo e a importância clínica associada à patogênese viral ainda não sejam bem estabelecidos.

Resultados conflitantes sobre a presença do HCV na saliva e em glândulas salivares dos pacientes com hepatite C crônica têm sido relatados na literatura. Adicionando evidências ao sialotropismo do HCV, alguns autores sugerem que as

alterações de glândulas salivares, como xerostomia, hipossalivação e sialoadenite podem representar manifestações extra-hepáticas bucais da hepatite C crônica.

A presença do HCV em amostras de saliva e de glândulas salivares pode representar uma evidência direta ou indireta do envolvimento do vírus nas alterações de glândulas salivares, tais como xerostomia, hipossalivação e sialoadenite. Assim sendo, estudos investigativos tentando esclarecer essa possível correlação, incluindo amostras representativas da população, técnicas com alta sensibilidade e especificidades para detecção do HCV, se fazem necessários.

2. Revisão de literatura

2.1 HEPATITE C CRÔNICA

O vírus da hepatite C (HCV), um RNA vírus, foi identificado por Choo e colaboradores em 1989, sendo considerado o maior causador de doença hepática crônica e o maior responsável por transplantes hepáticos na Europa e Estados Unidos (ALTER *et al.*, 2007). Em 1994, Simmonds e colaboradores estabeleceram uma classificação de variantes baseadas nas sequências genômicas do HCV em seis tipos ou genótipos, denominados 1a/1b, 2a/2b, 3, 4, 5 e 6 (NIH, 2002).

As principais formas de infecção pelo HCV incluem as hemotransfusões, o uso de drogas ilícitas, os transplantes de órgãos sólidos, as hemodiálises, a transmissão percutânea, e menos frequentemente, a transmissão sexual (MODI; LIANG, 2008). Em decorrência do maior controle dos hemocentros, a transmissão a partir de uso de drogas ilícitas tem se tornado, atualmente, a principal forma de aquisição do HCV (LUCIDARME *et al.*, 2007). Entretanto, em grande número de pacientes a forma de contaminação não pode ser identificada (GROSSMANN *et al.* 2007).

Estima-se que 180 milhões de indivíduos sejam infectados pelo HCV em todo o mundo (GHANY *et al.*, 2009). O Ministério da Saúde considera que a prevalência nacional se aproxima de 1,2% (BRASIL, 2008), podendo estar subestimada, devido à sub-notificação dos casos, aos aspectos assintomáticos da doença e às dificuldades de diagnóstico e tratamento (SOUZA *et al.*, 2004).

A doença crônica é assintomática ou oligossintomática na maioria dos casos, com manifestações clínicas somente em fases avançadas de acometimento hepático. O diagnóstico é, muitas vezes, casual a partir de exames de avaliação de rotina (BRASIL, 2008), por meio de triagem em hemocentros ou por sintomas não específicos, como a hemorragia digestiva alta, dificultando o diagnóstico precoce da doença (SOUZA *et al.*, 2004).

O percentual de pacientes com infecção crônica que evolue para cirrose hepática após 20 a 25 anos de infecção varia de 5% a 20%. Uma vez estabelecida a cirrose, cerca de 1 a 2% dos pacientes evoluem, anualmente, para o hepatocarcinoma (STRADER *et al.*, 2004). O risco de desenvolvimento de hepatocarcinoma em pacientes positivos para o HCV é cerca de 20 vezes maior que em pacientes negativos para esse vírus (SUN *et al.*, 2003). De acordo com NIH (2002), a hepatite crônica pelo vírus C pode ser letal em 5 a 10% dos pacientes após 10 a 30 anos de infecção, em razão de cirrose descompensada ou hepatocarcinoma.

Há poucas evidências de que o modo de transmissão e fatores virais, como a carga e o genótipo viral, possam influenciar na história natural da hepatite C crônica. Acredita-se que esses fatores tenham maior influência na resposta terapêutica do que na evolução da doença (GHANY *et al.*, 2009).

Não obstante, diversos fatores do hospedeiro têm influência na evolução da doença hepática, principalmente o uso de álcool (MUELLER *et al.*, 2009), a idade quando da exposição viral, o sexo masculino e a co-infecção com outros vírus, como o da hepatite B (HBV) e o da imunodeficiência adquirida (HIV), além de alterações no metabolismo do paciente (ALBERTI; BENVIGNÙ, 2003).

A ingestão de álcool, a aquisição do vírus C após os 40 anos e o sexo masculino estão associados à progressão mais rápida da doença, aumentando o risco de cirrose e suas complicações (NIH, 2002). Condições sistêmicas como a hemocromatose, a hemossiderose, a esteatose e a diabetes *mellitus* tipo II têm sido associadas à maior gravidade da hepatite C, contribuindo para o desenvolvimento de cirrose (ALBERTI; BENVIGNÙ, 2003).

Mais de 74% dos pacientes infectados pelo HCV pode desenvolver pelo menos uma manifestação extra-hepática (MEH) durante o curso da infecção (GALOSI *et al.*, 2007; ZIGNEGNO *et al.*, 2008). Essas MEH devem-se, possivelmente, a uma

infiltração viral nos tecidos envolvidos ou a mecanismos imunologicamente mediados (ARRIETA *et al.*, 2001).

Embora várias manifestações intrabucais tenham sido descritas como MEH em pacientes com o HCV, o líquen plano e a sialoadenite são consideradas como as mais frequentes nesse grupo de pacientes (LODI *et al.*, 1998; HENDERSON *et al.*, 2001; CARROZZO, 2001; FIGUEIREDO *et al.*, 2002; CARROZZO; GANDOLFO, 2003; CHAINANI-WU *et al.*, 2004; GROSSMANN *et al.*, 2007; CARROZZO, 2008; GROSSMANN *et al.*, 2009). Doenças relacionadas a distúrbios de glândulas salivares, como xerostomia, síndrome de Sjögren e sialoadenites (CACCOUB *et al.*, 2000; NAGAO *et al.*, 2003; OHOKA *et al.*, 2003) têm sido associadas à infecção crônica pelo vírus C. O HCV foi detectado na saliva (ROY *et al.*, 1999; HERMIDA *et al.*, 2002) e tecido epitelial de glândulas salivares (ARRIETA *et al.*, 2001) de pacientes com hepatite C, sugerindo uma relação entre alterações de glândulas salivares e a infecção pelo HCV.

Ramos-Casals *et al.* (2001) sugerem que o HCV tenha um triplo tropismo tecidual: hepatotropismo, linfotropismo e sialotropismo. Esse fato poderia explicar a grande prevalência de síndrome *sicca*, crioglobulinemia e desordens linfoproliferativas observadas nos pacientes com hepatite C crônica. Autores como Caccoub *et al.* (1999) sugerem como principais fatores de risco para MEH a idade avançada, o sexo feminino e a fibrose hepática extensa. Entretanto, a real patogênese que envolve o HCV e as diferentes MEH que acometem esse grupo de pacientes não está, ainda, bem estabelecida.

2.2 ALTERAÇÕES DE GLÂNDULAS SALIVARES E HEPATITE C CRÔNICA

A partir dos achados de Haddad *et al.* (1992), associando o HCV às alterações de glândulas salivares, a xerostomia, a sialoadenite e a Síndrome de Sjögren têm sido as mais descritas na literatura (NAGAO *et al.*, 2003; OHOKA *et al.*, 2003; CARROZZO, 2008).

A detecção do HCV RNA por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase por transcriptase reversa (RT-PCR) em amostras de saliva foi descrita em diferentes estudos, com frequências que variam de 0% (FRIED *et al.*, 1992) a 100% (TAKAMATSU *et al.*, 1990). Gonçalves *et al.* (2005), em um estudo realizado em pacientes brasileiros, detectou o HCV RNA em 20,5% de amostras salivares. Diferentes estudos mostraram, também, que pacientes com hepatite C crônica apresentam maior frequência de infiltrado inflamatório linfocitário em glândulas salivares que indivíduos não infectados pelo HCV (LODI *et al.*, 1998; NIH, 2002; PIRISI *et al.*, 1994; ZIGNEGO *et al.*, 2008). A grande variabilidade das metodologias empregadas nos diferentes estudos pode ser responsável pelas discrepâncias nos resultados relatados na literatura.

2.2.1 XEROSTOMIA, HIPOSSALIVAÇÃO E SIALOADENITE

A xerostomia refere-se à sensação subjetiva de boca seca e acomete, principalmente, mulheres acima de 60 anos de idade (DAVIES *et al.*, 2002). Dentre os fatores relacionados com essa desordem pode-se citar a aplasia de glândula salivar, a idade avançada, o fumo, a respiração bucal, a radioterapia local, a síndrome de Sjögren, a infecção pelo HIV, HTLV e HCV, além de alguns medicamentos como antihipertensivos, antidepressivos, antihistamínicos, descongestionantes, antipsicóticos, e anticolinérgicos (PORTER *et al.*, 2004).

A associação entre xerostomia e evidência objetiva de disfunção da glândula salivar, como a hipossalivação, é descrita na literatura (BERGDAHL *et al.*, 2000; JENSEN *et al.*, 2003). Alguns autores sugerem que a mensuração do fluxo salivar poderia ser importante para identificação de hipofunção ou anormalidade da glândula salivar, como na Síndrome de Sjögren (VITALI *et al.*, 2002).

A xerostomia acomete de 10 a 20% dos pacientes infectados pelo HCV (CACOUB *et al.*, 1999, 2000), embora uma fraca associação entre queixa e evidência objetiva de hipossalivação tenha sido relatada (FERREIRO *et al.*, 2002). Diferentes

estudos mostram que mais de 80% dos pacientes infectados com o HCV pode manifestar algum tipo de alteração salivar (ALMASIO *et al*, 1992; HADDAD *et al*, 1992; TALIANI *et al*, 1997; CACOUB *et al*, 1999, 2000; VERBAAN *et al*, 1999; HENDERSON *et al*, 2001; LOUSTAUD-RATTI *et al*, 2001; FERREIRO *et al*, 2002), representada, principalmente, por sinais histológicos de sialoadenite leve (HADDAD *et al*, 1992; LOUSTAUD-RATTI *et al*, 2001). Entretanto, a evidência clínica de xerostomia ou de xeroftalmia está frequentemente ausente (PIRISI *et al*, 1994). Dessa forma, novas investigações de associação entre xerostomia, evidência objetiva de hipossalivação e detecção do HCV na saliva de pacientes com hepatite C crônica são necessárias para elucidar as discordâncias encontradas na literatura.

A sialoadenite e a Síndrome de Sjögren são as alterações de glândulas salivares mais associadas à infecção pelo HCV (CARROZZO, 2008) sendo as sialoadenites diagnosticadas a partir da história e manifestações clínicas do paciente (WANG *et al.*, 2009). Entretanto, o diagnóstico histológico utilizando os critérios de Chisholm e Mason (1968), pode classificar a sialoadenite baseado na quantificação do infiltrado inflamatório no tecido glandular. Já a Síndrome de Sjögren (SS), uma desordem reumática auto-imune, acomete primariamente as glândulas salivares e lacrimais resultando em xerostomia e xeroftalmia (síndrome de Sjögren primária), decorrentes de uma infiltração linfocitária glandular (FOX, KING, 1992). Quando associada à outra doença auto-imune como artrite reumatóide ou lúpus eritematoso sistêmico, é classificada como síndrome de Sjögren secundária (FOX, 2005). Acometem, predominantemente, pacientes do sexo feminino e de meia-idade (FOX *et al.*, 2000; FOX *et al.*, 1999), sendo o diagnóstico baseado no critério proposto pelo Consenso do Grupo Americano e Europeu de 2002 (VITALI *et al.*, 2002).

Pacientes infectados pelo HCV frequentemente apresentam uma forma de sialoadenite semelhante, histologicamente, à Síndrome de Sjögren primária, nomeada de Sjögren-like, apesar de suas distintas características clínicas (SCOT *et al.*, 1997;

MADRID *et al.*, 2004). É possível, nas sialoadenites associadas ao HCV, que as células epiteliais das glândulas salivares, em contato contínuo com a saliva contaminada com o HCV, sejam alvos indiretos de mecanismos imunológicos. Esses seriam suscitados pela presença do vírus explicando, assim, a infiltração linfocítica observada nesses quadros (SCOT *et al.*, 1997).

O HCV foi detectado em glândulas salivares (parótidas, labiais e submandibulares) de pacientes com hepatite C crônica (ARRIETA *et al.*, 2001), embora os resultados sejam contraditórios (TALIANI *et al.*, 1997). Estudos que utilizam métodos mais sensíveis e específicos para detecção do RNA viral nas glândulas salivares vêm sendo realizados para se identificar quais células são especificamente infectadas (COLL *et al.*, 1997; ROY, BAGG, 1999; ARRIETA *et al.*, 2001).

Não há, também, evidências conclusivas da possível relação entre um quadro grave de sialoadenite com um quadro avançado de hepatite C crônica (OHOKA *et al.*, 2003). Fatores relacionados ao vírus, tais como o genótipo e a carga viral, também parecem não apresentar relação com a sialoadenite nesses pacientes (PAWLOTSKY *et al.*, 1994; LOUSTAUD-RATTI *et al.*, 2001). No entanto, a real associação entre a presença do HCV na saliva e em glândulas salivares e as alterações de glândulas salivares como xerostomia, hipossalivação e sialoadenite ainda não está bem estabelecida.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Investigar possíveis alterações de glândulas salivares em pacientes com hepatite C crônica.

3.2. Objetivos específicos

1. Investigar a presença do vírus da hepatite C (HCV) em amostras de saliva e em amostras de glândulas salivares pela técnica da *nested*-RT-PCR.
2. Determinar a prevalência de xerostomia e hipossalivação, e sua relação com a presença do HCV na saliva e em glândulas salivares.
3. Avaliar a prevalência de sialoadenite e Síndrome de Sjögren clínica e histologicamente, relacionando com a detecção do HCV na saliva e em glândulas salivares.
4. Determinar a prevalência de alterações de mucosa bucal encontrada nesse grupo de pacientes e sua relação com xerostomia, hipossalivação e sialoadenite e a presença do HCV na saliva e em glândulas salivares.
5. Correlacionar as alterações das glândulas salivares com dados demográficos, relativos à doença hepática e à história médica dos pacientes.

4. Metodologia

Foram avaliados, através de um estudo transversal, pacientes com hepatite C crônica do Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG (AHEV-IAG/HC-UFMG). Pacientes com co-infecção pelo HIV, HLTV ou HBV, e sob tratamento contra o HCV foram excluídos do estudo.

O cálculo amostral para o estudo piloto foi baseado no dado de prevalência do HCV em saliva de pacientes com hepatite C crônica (20,5%) encontrado por Gonçalves *et al.* (2005), totalizando 24 pacientes. A partir da prevalência encontrada (45,2%) no estudo piloto, a amostra foi recalculada obedecendo a fórmula de estimativa de proporção (KIRKWOOD, 1996), utilizando-se nível de precisão de 2% e o nível de confiança de 95%, e considerando-se 12 novos casos de hepatite C crônica por mês, durante 12 meses. A amostra do estudo principal foi determinada em 136 pacientes. Objetivando-se investigar possíveis diferenças de prevalência do HCV RNA nos fluxos salivares não-estimulado (FSNE) e estimulado (FSE) usou-se 53 amostras de saliva (estudo preliminar). Como não houve diferença estatisticamente significativa de prevalência entre os fluxos estudados, optou-se pela investigação do HCV RNA apenas nos FSNE dos 83 pacientes restantes (Fig. 1).

Os pacientes foram submetidos à anamnese e exame intrabucal de rotina, sendo compilados os dados demográficos, relativos à história médica e à doença hepática em ficha clínica elaborada para esse estudo (ANEXO 1).

Inicialmente, os pacientes responderam a um questionário relativo à xerostomia, a fim de quantificar a percepção de sensação de boca seca, usando-se o método da Escala Visual Analógica (EVA) (PAI *et al.*, 2001) (ANEXO 2). Quando presente, a xerostomia foi classificada em leve, moderada e severa de acordo com os critérios de Ferreira e colaboradores (2002). Quando necessário, foi instituído tratamento com saliva artificial.

Foi realizada a mensuração do FSNE e FSE na consulta inicial, em todos os pacientes. Os fluxos foram coletados utilizando-se o método da drenagem e o método da borracha, respectivamente (ALMSTAHL; WIKSTROM, 2003). No momento da coleta os pacientes foram colocados em um ambiente tranquilo, abstendo-se de água, alimentos e higienização por 60 minutos. Nos casos de portadores de próteses, foi solicitada a sua remoção.

Para o FSNE os pacientes foram orientados a depositar toda saliva acumulada em um tubo Falcon estéril de 50mL, durante 3 minutos. O FSE foi coletado com uso de borracha estéril, seguindo-se o mesmo protocolo. O volume de cada coleta foi medido e ajustado para fluxo em ml/min para cada paciente (NAVAZESH *et al.*, 2002). Para o FSNE, o fluxo $\leq 0,1$ ml/min foi considerado hipossalivação, e para o FSE os valores de hipossalivação \leq que 0,7 ml/min (JENSEN *et al.*, 2003).

As amostras de saliva foram armazenadas em freezer a -80°C no Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisa René Rachou-Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), para a investigação quanto à presença do HCV RNA por meio da técnica de *nested*-RT-PCR (GONÇALVES *et al.*, 2005). Para a extração do RNA viral nas amostras de saliva utilizou-se o kit Qiaamp viral RNA. O cDNA foi sintetizado utilizando-se um iniciador específico da região 5' não codificante (5' UTR) e transcriptase reversa (Superscript, Invitrogen). A amplificação do cDNA foi feita pela técnica de *nested*-RT-PCR com iniciadores específicos (OLIVEIRA *et al.*, 1999).

Após a obtenção dos dados relativos à xerostomia e fluxo salivar, todos os pacientes foram encaminhados à Clínica de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia da UFMG para coleta de fragmento de glândula salivar menor, no lábio inferior. A amostra tecidual foi dividida em duas partes: uma secção foi processada, corada por hematoxilina-eosina e examinada histologicamente para análise da morfologia glandular e presença de infiltrado inflamatório (CHISHOLM e MASON,

1968). A outra parte da amostra foi armazenada em RNA-*later overnight* a 4^o C, e em seguida congelada a -20^o C para investigação do HCV RNA no tecido glandular através da extração do RNA viral (Kit RNAeasy fini handbook Qiagen). A obtenção do cDNA e sua amplificação seguiram a técnica utilizada para a saliva, sendo todo o tecido glandular masserado, previamente à extração do RNA viral.

Os pacientes foram ainda investigados quanto à presença de sinais e sintomas clínicos compatíveis com sialoadenite e Síndrome de Sjögren, bem como avaliados quanto à presença de alterações de mucosa bucal, incluindo variações de normalidade e lesões de mucosa.

Para a análise qualitativa e quantitativa do infiltrado inflamatório das amostras de glândulas salivares, quando presente, utilizou-se os critérios de Chisholm e Mason de 1970. Foram confeccionadas três lâminas de cada caso com cortes seriados de 4 µm de espessura. Foi realizada a correlação inter-examinadores, por meio do teste de Kappa, que mostrou concordância de 85%. Em seguida, todas as lâminas de cada caso foram avaliadas por um único examinador, sendo uma selecionada, levando-se em consideração aquela com maior grau de infiltrado inflamatório.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP-UFMG) e pela Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão do Hospital das Clínicas (DEPE-HC) segundo Parecer nº ETIC192/06 (ANEXO 3) e nº 080/06 (ANEXO 4), respectivamente. Todos os pacientes foram convidados a participar do estudo por meio de assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 5).

Os dados obtidos foram armazenados e a análise estatística uni e multivariada (regressão logística) realizada por meio do programa Stata versão 10.0, e EPIINFO

3.4.3.

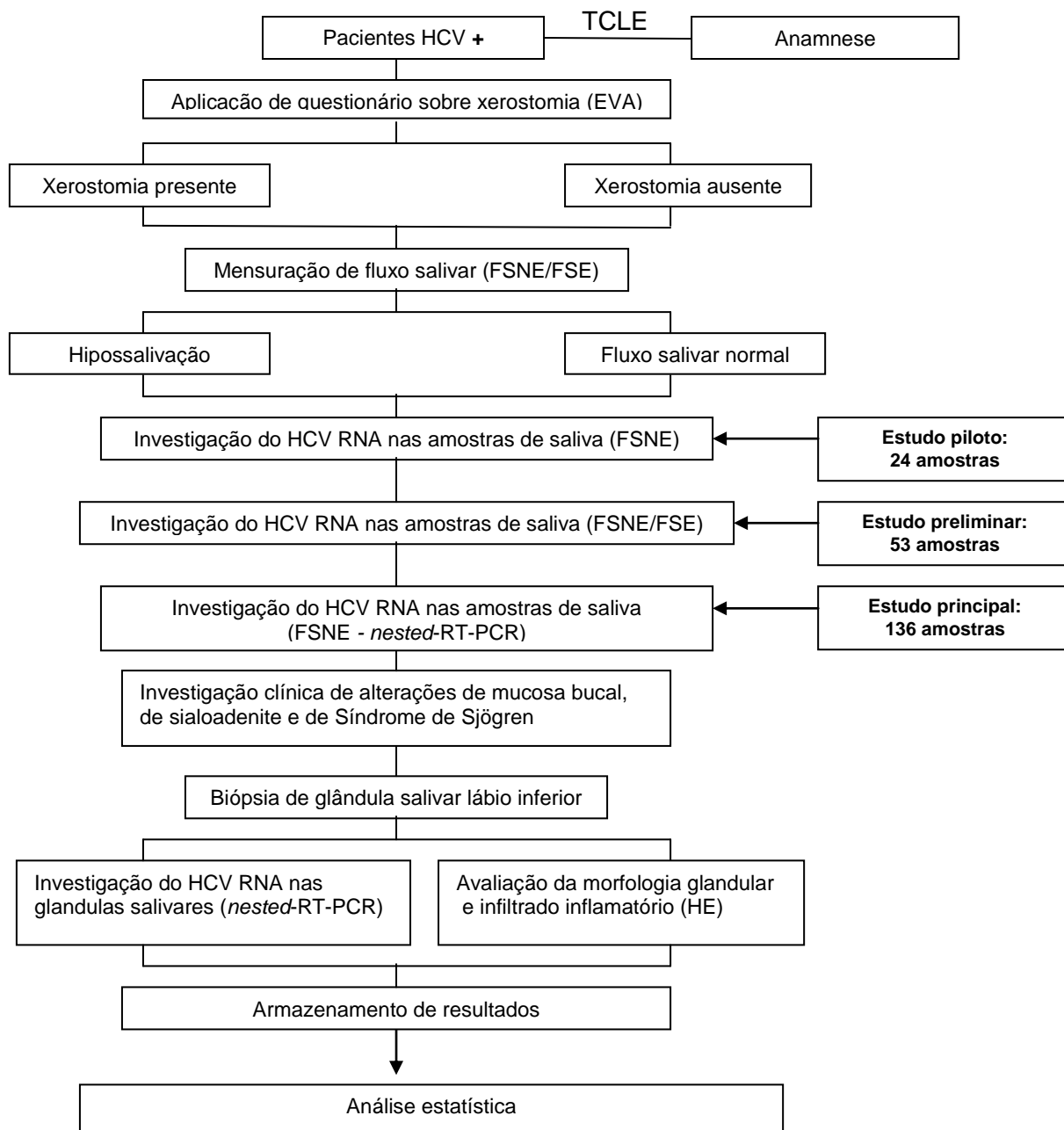


Figura 1 – Fluxograma de atividades

5. Referências bibliográficas

1. Alberti A, Benvegnù L. Management of Hepatitis C. *J Hepatol.* 2003; 38:104-118.
2. Almasio P, Provenzano G, Scimemi M, Cascio G, Craxì A, Pagliaro L. Hepatitis C virus and Sjögren's syndrome. *Lancet.* 1992; 339:989-90.
3. Almstahl A, Wikstrom M. Electrolytes in stimulated whole saliva in individuals with hyposalivation of different origins. *Arch Oral Biol.* 2003; 48: 337-44.
4. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol.* 2007; 13:2436-41.
5. Arrieta JJ, Rodríguez-Iñigo E, Ortiz-Movilla N, Bartolomé J, Pardo M, Manzarbeitia F, Oliva H, Macías DM, Carreño V. In situ detection of hepatitis C virus RNA in salivary glands. *Am J Pathol.* 2001; 158:259-64.
6. Bergdahl M, Bergdahl J. Low unstimulated salivary flow and subjective oral dryness: association with medication, anxiety, depression, and stress. *J Dent Res.* 2000; 79:1652-8.
7. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Executiva. Programa Nacional de Hepatites Virais. Hepatites Virais: o Brasil está atento / Ministério da Saúde, Secretaria Executiva, Programa Nacional de Hepatites Virais. – Brasília: Ministério da Saúde, 2008.
8. Cacoub P, Poynard T, Ghillani P, Charlotte F, Olivi M, Piette JC, Opolon P. Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C. *Arthritis & Rheumatism* 1999; 42: 2204-12.
9. Cacoub P, Renou C, Rosenthal E, Cohen P, Loury I, Loustaud-Ratti V, Yamamoto AM, Camproux AC, Hausfater P, Musset L, Veyssier P, Raguin G, Piette JC. Extrahepatic manifestations associated with hepatitis C virus infection: a prospective multicenter study of 321 patients. *Med.* 2000; 79:47-56.
10. Carrozzo M. Oral health in patients with hepatitis C virus infection: an underestimated problem? *Oral Dis.* 2001; 7: 267-270.
11. Carrozzo M, Gandolfo S. Oral diseases possibly associated with hepatitis C virus. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2003; 14: 115-27.
12. Carrozzo M. Oral diseases associated with hepatitis C virus infection. Part 1. Sialadenitis and salivate glands lymphoma. *Oral Dis* 2008; 14: 123-30.
13. Chainani-Wu N, Lozada-Nur F, Terrault N. Hepatitis C virus and lichen planus:

- a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 98:171-183.
14. Chisholm DM, Mason DK. Labial salivary gland biopsy in Sjogren's disease. *J Clin Path.* 1968; 21:656-660.
 15. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a bloodborne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science.* 1989; 244: 359-62.
 16. Coll J, Gambús G, Corominas J, Tomás S, Esteban JI, Guardia J. Immunohistochemistry of minor salivary gland biopsy specimens from patients with Sjögren's syndrome with and without hepatitis C virus infection. *Ann Rheum Dis.* 1997; 56:390-2.
 17. Davies AN, Broadley K, Beighton D. Salivary gland hypofunction in patients with advanced cancer. *Oral Oncol.* 2002; 38: 680-685.
 18. Ferreiro MC, Prieto MH, Rodríguez SB, Vázquez RL, Iglesias AC, Dios PD: Whole stimulated salivate flow in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Oral Pathol Med* 2002; 31:117-20.
 19. Figueiredo LC, Carrilho FJ, de Andrade HF, Migliari DA.. Oral lichen planus and hepatitis C virus infection. *Oral Dis.* 2002; 8:42-46.
 20. Fox RI, King HI. Patogenesis of Sjögren's syndrome. *Reum Dis Clin N Am.* 1992; 18:517-38.
 21. Fox RI, Tornwall J, Michelson P. Current issues in the diagnosis and treatment of Sjogren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol.* 1999; 11:364-71.
 22. Fox RI, Stern M, Michelson P. Update in Sjogren syndrome. *Curr Opin Rheumatol.* 2000; 12:391-8.
 23. Fox RI. Sjogren's syndrome. *Lancet.* 2005; 366:321-31.
 24. Fried MW, Shindo M, Fong TL, Fox PC, Hoofnagle JH, Bisceglie M: Absence of hepatitis C viral RNA from saliva and semen of patients with chronic hepatitis c. *Gastroenterol.* 1992; 102:1306–1308.
 25. Galossi A, Guarisco R, Bellis L, Puoti C. Extrahepatic manifestations of chronic HCV infection. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2007; 16:65-73.
 26. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* 2009; 49:1335-74.

27. Gonçalves PL, Cunha CB, Busek SC, Oliveira GC, Ribeiro-Rodrigues R, Pereira FE. Detection of hepatitis C virus rna in saliva samples from patients with seric anti-HCV antibodies. *Braz J Infect Dis.* 2005; 9:28-34.
28. Grossmann SMC, Aguiar MCF, Teixeira R, Carmo MAV. Oral lichen planus and chronic hepatitis C: a controversial association. *Am J Clin Pathol.* 2007; 127:800-4.
29. Grossmann SMC, Teixeira R, Aguiar MC, Moura M, Carmo MA. Oral mucosal conditions in chronic hepatitis C Brazilian patients: a cross-sectional study. *J Public Health Dent.* 2009; 69:168-175.
30. Haddad J, Deny P, Munz-Gotheil C, Ambrosini JC, Trinchet JC, Pateron D, Mal F, Callard P, Beaugrand M. Lymphocytic sialadnitis of sjogren's syndrome associated with chronic hepatitis C virus liver disease. *Lancet* 1992; 339:321-32.
31. Henderson L, Muir M, Mills PR, Spence E, Fox R, McCrudden EA, Bagg J. Oral health of patients with HCV infection: a pilot study. *Oral Dis* 2001; 7 271-75.
32. Hermida M, Ferreiro MC, Barral S, Laredo R, Castro A, Diz Dios P. Detection of HCV RNA in saliva of patients with hepatitis c virus infection by using a highly sensitive test. *J Virol Methods* 2002; 101:29-35.
33. Jensen SB, Pedersen AM, Reibel J, Nauntofte B. Xerostomia and hypofunction of the salivate glands in cancer therapy. *Support Care Cancer* 2003; 11:207-25.
34. Kirkwood, B. *Essentials of Medical Statistic.* Oxford: Blackwell Science 1996;38-40, 191-200.
35. Lodi G, Porter SR, Scully C. Hepatitis C virus infection: Review and implications for the dentist. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998; 86:8-22.
36. Loustaud-Ratti V, Riche A, Liozon E, Labrousse F, Soria P, Rogez S, Babany G, Delaire L, Denis F, Vidal E. Prevalence and characteristics of Sjögren's syndrome or Sicca syndrome in chronic hepatitis C virus infection: a prospective study. *J Rheumatol.* 2001; 28:2245-51.
37. Lucidarme D, Decoster A, Fremaux D, Harbonnier J, Jacob C, Vosgien V, Josse P, Villegier P, Henrio C, Prouvost-Keller B, Saccardy C, Lemaire M, Vazeille G, Duchene C, Thuillier M, Colbeaux C, Lefebvre AM, Forzy G, Filoche B. Routine practice HCV infection screening with saliva samples: multicentric

- study in an intravenous drug user population. *Gastroenterol Clin Biol*. 2007; 31:480-4.
38. Madrid C, Courtois B, Duran D. Chronic Sialadenitis revealing hepatitis C: a case report. *Med Oral*. 2004; 9: 328-32.
 39. Modi AA, Liang TJ. Hepatitis C: a clinical review. *Oral Dis*. 2008; 14:10-4.
 40. Mueller S, Millionig G, Seitz HK. Alcoholic liver disease and hepatitis C: a frequently underestimated combination. *World J Gastroenterol*. 2009; 15:3462-71.
 41. National Institutes of Health. Consensus development conference statement: management of hepatitis C. *Hepatology*. 2002; 36:3-20.
 42. Navazesh M. Dry mouth: aging and oral health. *Compend Contn Educ Dent*. 2002; 23:41-8.
 43. Ohoka S, Tanaka Y, Amako Y, Kohara M, Ishidate K, Watanabe M, Takahashi Y, Sato C. Sialadenitis in patients with chronic hepatitis C is not directly related to hepatitis C virus. *Hepatology Res*. 2003; 27:23-29.
 44. Oliveira GC, Carmo RA, Rocha MO, Silva MO, Lima AT, Guimarães MD, Corrêa-Oliveira R: Hepatitis C virus genotypes in hemophiliacs in the state of Minas Gerais, Brazil. *Transfusion* 1999; 39:1194-9.
 45. Pawlotsky JM, Ben Yahia M, Andre C, Voisin MC, Intrator L, Roudot-Thoraval F, *et al*. Immunological disorders in C virus chronic active hepatitis: a prospective case-control study. *Hepatology*. 1994; 19:841-8.
 46. Pai S, Ghezzi EM, Ship JA. Development of a Visual Analogue Scale questionnaire for subjective assessment of salivary dysfunction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001; 91: 311-6.
 47. Pirisi M, Scott C, Fabris C, Ferraccioli G, Soardo G, Ricci R, Toniutto P, Avellini C, Vitulli D, Miotti AM. Mild sialoadenitis: a common finding in patients with hepatitis C virus infection. *Scand J Gastroenterol*. 1994; 29:940-2.
 48. Porter SR, Scully C, Hegarty AM. An update of the etiology and management of xerostomia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004; 97:28-46.
 49. Ramos-Casals M, Garcia-Carrasco M, Cervera R, Font J. Is hepatitis C virus a sialotropic virus? *Am J Pathol*. 2001; 159:1593-4.

50. Roy Km, Bagg J, Mccarron B. The effect of saliva specimen collection, handling and storage protocols on hepatitis C virus (HCV) RNA detection by PCR. *Oral Dis.* 1999; 5:123-7.
51. Scott CA, Avellini C, Desinan L, Pirisi M, Ferraccioli GF, Bardus P, Fabris C, Casatta L, Bartoli E, Beltrami CA. Chronic lymphocytic sialoadenitis in HCV-related chronic liver disease: comparison of Sjögren's Syndrome. *Histopathol.* 1997; 30:41-8.
52. Souza FC, Andrade DC, Campos VF, Teixeira R. Aspectos clínicos da hepatite C crônica: experiência do Ambulatório de Hepatites Virais/ Instituto Alfa de Gastroenterologia/Hospital das Clínicas da UFMG. *Rev Med Minas Gerais.* 2004; 14:136-41.
53. Strader DB, Wright T, Thomas DL, Seeff LB; American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. *Hepatology.* 2004 Apr;39(4):1147-71.
54. Sun CA, Wu DM, Lin CC, Lu SN, You SL, Wang LY, Wu MH, Chen CJ. Incidence and cofactors of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma: a prospective study of 12,008 men in Taiwan. *Am J Epidemiol.* 2003; 157:674-82.
55. Taliani G, Celestino D, Badolato MC, Pennica A, Bozza A, Poliandri G, Ricciari V, Benfari G, Sebastiani A, De Bac C, Quaranta G, Aceti A. Hepatitis C virus infection of salivary gland epithelial cells. Lack of evidence. *J Hepatol.* 1997; 26: 1200-6.
56. Takamatsu K, Koyanagi Y, Okita K, Yamamoto N. Hepatitis C virus in saliva. *Lancet* 1990; 336:1515.
57. Verbaan H, Carlson J, Eriksson S, Larsson A, Liedholm R, Manthorpe R, Tabery H, Widell A, Lindgren S. Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C infection and the interrelationship between primary Sjögren's syndrome and hepatitis C in Swedish patients. *J Intern Med.* 1999; 245:127-32.
58. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, Daniels TE, Fox PC, Fox RI, Kassan SS, Pillemer SR, Talal N, Weisman MN, European Study Group on Classification Criteria for Sjögren's Syndrome. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis.* 2002; 61: 554-8.

59. Wang CC, Morishima C, Chung M, Engelberg R, Krantz E, Krows M, Sullivan DG, Gretch DR, Corey L. High serum hepatitis c virus (HCV) RNA load predicts the presence of HCV RNA in saliva from individuals with chronic and acute HCV infection, published in J Infect Dis. 2006; 193:672-6.
60. Zignego AL, Craxì A. Extrahepatic manifestations of hepatitis C virus infection. Clin Liver Dis. 2008; 12:611-36.

6. Resultados

ARTIGO 1

(Publicado na revista American Journal of Clinical Pathology)

ARTIGO 2

(Publicado na revista Journal of Public Health Dentistry)

ARTIGO 3

(Submetido para Indian Journal of Dental Research)

Association between salivary flow and HCV RNA detection in saliva samples from patients with chronic hepatitis C: a preliminary study

Running title: HCV in saliva from Brazilian patients

Aim. The aim of this study was to evaluate the frequency of HCV RNA in saliva samples from a group of Brazilian patients with chronic hepatitis C in the stimulated and the non stimulated salivary flows, considering the possibility of the saliva may be the source of HCV infection in some cases.

Subjects and Methods. Symptoms of xerostomia were assessed, and matched non stimulated and stimulated saliva samples from 24 chronically infected HCV patients were collected and stored at -80°C . The presence of HCV RNA was investigated by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT- nested-PCR). Data regarding age, gender, time lapsed since the diagnosis, risk factors for HCV infection, status of liver biopsies (Metavir), xerostomia and hyposalivation were assessed.

Results. In eleven non stimulated saliva samples (45.8%) and in 14 stimulated saliva samples (58.3%) of the 24 patients HCV RNA was detected. This difference was not statistically significant ($p=0.47$). Six patients (25.0%) complained of oral dryness, but in only 3 patients (12.5%) could the hyposalivation be demonstrated. No significant correlation between the presence of HCV RNA in saliva and age, gender, clinical presentation, risk factors for HCV infection, or xerostomia could be observed.

Conclusion. The frequency of HCV RNA in saliva samples in Brazilian patients with chronic hepatitis C was higher than that previously reported in Brazil, and differences between non stimulated and stimulated saliva were not observed. According to these results, efforts should be made to clarify the possible role of the presence of HCV in saliva and its possible infective capacity.

Key Words: HCV RNA; saliva; chronic hepatitis C; HCV.

INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV) infection is a major cause of chronic liver disease and liver-related morbidity and mortality worldwide [25] and is the most prevalent reason for liver transplants in Europe and in the USA [26]. About 170 million people around the world are infected with HCV [25], with an estimated prevalence of 1.23% in the Brazilian population [30].

Routes of HCV transmission include blood transfusion, intravenous drug use, solid organ transplants, hemodialysis, and, less frequently, sexual intercourse [25]. However, in a large number of hepatitis C carriers the route of infection can not be identified [13].

Up to 74% of the HCV-infected patients may develop at least one extra hepatic manifestation (EHM) during the course of the infection [3], such as salivary gland disorders [38]. This association was first reported by Haddad et al. [14] in 1992 where the authors suggested that an autoimmune reaction could explain lymphocytic infiltration, even if in uninfected organs. Later reports found histologic evidence of salivary gland lymphocytary infiltration in patients with chronic hepatitis C in higher percentages than in healthy individuals [28; 34].

The presence of the HCV RNA by RT-PCR in saliva was detected in different studies, with a frequency ranging from 0 to 100% [11; 35]. Gonçalves et al. [12], in a study conducted with Brazilian patients, detected the HCV RNA in 20.5% of the saliva samples in patients who had HCV RNA in their plasma. The heterogeneity of study design, and population and different methodologies used as saliva sampling methods may be responsible for these discrepancies. However, as the source of HCV infection in many patients with chronic hepatitis C cannot be identified [13], these findings suggest that the saliva might be, at least in some cases, an important HCV transmission route in patients with whom it is impossible to determine any risk factor which may point toward the acquisition of the infection [10].

Xerostomia in patients with chronic hepatitis C ranges from 10 to 20% [3; 22]. The association between symptoms of dry mouth and objective evidence of salivary gland dysfunction has been described in previous literature [10; 15]. It has been suggested that whole saliva could be used as a screening test for identifying a suspected exocrine hypofunction and an abnormality in the salivary gland, such as the Sjögren Syndrome [36].

As the presence of HCV in saliva samples may be an indirect evidence of salivary gland involvement, the aim of this study was to investigate the frequency of HCV RNA in saliva samples from a group of Brazilian patients with chronic hepatitis C in the stimulated and the non stimulated salivary flows, considering the possibility of the saliva may be the source of HCV infection at least in some cases.

PATIENTS AND METHODS

Patients

Twenty four patients with chronic hepatitis C diagnosed in the Viral Hepatitis Ambulatory Clinic of Instituto Alfa de Gastroenterologia at the Clinical Hospital of the Universidade Federal de Minas Gerais (IAG-HC/UFMG), Belo Horizonte, Brazil were evaluated. All patients were tested using the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and tested positive for serum HCV RNA. The patients were selected according to the following inclusion criteria: absence of other concomitant liver diseases, and tested negative for HIV-1/2 or HBV co-infections. Patients receiving anti-viral treatment were also not included in this study. Liver biopsy, ultrasonography, and upper gastrointestinal endoscopy were performed, when necessary, to confirm the diagnosis of significant liver disease.

Data regarding age, gender, time lapsed since the diagnosis, risk factors for HCV infection, symptoms, status of liver biopsies (Metavir), and genotype were assessed through the medical records.

Intra-oral examination was performed on each patient under artificial light, using disposable retractors and universal biohazard safety procedures. Patients who needed incisional biopsies and histopathologic examinations for final diagnosis of oral mucosal lesions were directed to the Department of Oral Pathology at the School of Dentistry of Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Xerostomia

All patients were evaluated regarding the symptoms of xerostomia, as described by Ferreiro et al.[9]. Patients that complained of dry mouth were submitted to treatment with artificial saliva gel (Oral Balance- Biotene®).

Saliva samples

The stimulated and the non stimulated salivary flows were collected as follow: patients were requested to refrain from eating, drinking, and oral hygiene procedures for 60 min before saliva collection. The spitting method was employed as follows: for the whole non stimulated salivary flow (NSSF), the patients spit into a sterile 50 ml Falcon tube for three minutes. Rates $>0.1\text{ml/min}$ were considered normal [18]. For the whole stimulated salivate flow (SSF), the patients chewed a sterile rubber cylinder and spit into a sterile 50 ml Falcon tube for three minutes. Rates $>0.7\text{ml/min}$ were considered normal [18].

Saliva samples (NSSF and SSF) were stored at -80°C , and the elapsed time between the sample collection and cryopreservation was always less than two hours.

Nested RT-PCR for detection of HCV RNA in saliva

RNA extraction was performed using a commercial viral RNA isolation kit (Qiaamp, Qiagen, Hildem Germany) following manufacturer's instructions. Nested RT-PCR was carried out, as described by Chan et al. [6], by amplifying a fragment of 251 bases pairs from 5'UTR region of HCV. Minor modifications were introduced by Oliveira et al. [27]. Briefly, single-strand cDNA was synthesized from 18 μL of the RNA sample at

42°C for 50 minutes with 200 U of reverse transcriptase (Superscript II, GIBCO, BRL, Rockville, MD, USA) in 30 µL of manufacturer supplied buffer containing 10 pmole of primer 209 (ATACTCGAGGTGCACGGGTCTACGAGACCT), 10 mM of each dNTP, and 10nM of dithiothreitol. For the first-round of PCR, 2µL of cDNA were added to a mixture containing 2 µl of 10x of the supplied PCR buffer, 5mM of MgCl₂, 10 mM of each dNTP, 10 pmole of primers 939 (CTGTGAGGAACTACTGTCTT) and 209, and 5U of Taq DNA polymerase (GIBCO/ BRL). The mixture was cycled 30x in a thermocycler (Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400) at 95°C for 5 minutes, 95°C for 1 minute, 50°C for 1 minute, 72°C for 1 minute, and 1x 72°C for 1 minute. The second-round of PCR (nested) was carried out as above, using primers 940 (TTCACGCAGAAAGGGTCTAG) and 211 (CACTCTCGGAGCACCCCTATCAGGCAGT) as well as 1.5U of Taq polymerase. The PCR products were electrophoresed in a 6% polyacrylamide gel, using a vertical electrophoresis apparatus (Model S2 Life Technologies Inc.) and stained with silver nitrate. The banding pattern was visualized and analyzed as described by McOmish et al. (1994).

Statistical Analysis and Ethical Aspects

Salivary flow and the presence of HCV RNA in the saliva were analyzed in relation to demographical, clinical, and analytical variables by applying EpiInfo version 3.0 software developed by the Center for Disease Control and Prevention. The Chi-square or Fisher's exact tests were used to compare proportions and *p* values lower than 0.05 were considered significant.

This study was approved by the Ethical Committee on Surveys from UFMG, and an informed consent was obtained from all patients.

RESULTS

The group studied consisted of 13 females (54.2%) and 11 (45.8%) males, with a mean age of 52.4 years (range 29-73 years of age). Sources of infection included blood

transfusions in 10 cases (41.7%), intravenous drug use in 4 cases (16.7%), percutaneous exposure in 2 cases (8.3%), and others in 4 cases (16.7%). Risk factors could not be identified in 4 patients (16.7%). The mean time lapsed from the diagnosis of hepatitis C virus infection was 3.1 years (range 0.1-12 years). Fourteen patients (58.3%) were asymptomatic carriers and 10 patients (41.7%) presented clinical symptoms. The liver status (Metavir) was determined in 13 patients, whereas the viral genotype has been determined in only 5 patients. These findings are summarized in table 1.

HCV RNA was detected in non stimulated saliva samples from 11 patients (45.8%) with chronic hepatitis C (4 women and 7 men) and in 14 patients (58.3%) of stimulated saliva samples (6 women and 8 men), with no statistical difference. Seven patients presented HCV RNA in non stimulated and stimulated saliva samples simultaneously (Table 2).

As can be observed in table 3, among the 4 patients in whom the route of infection was unknown, 2 presented the HCV RNA in the NSSF, while only 1 remained positive when the SSF was tested (Table 3).

Of the 13 patients in whom the liver status (Metavir) was established, 6 were diagnosed as A2F4 (advanced disease), whereas in 5 patients HCV RNA was detected in at least one saliva sample (Table 4).

Six patients (25.0%) complained of oral dryness - xerostomia. In 4 patients (16.7%), xerostomia was considered to be mild, while in 2 (8.3%), it was moderate. Considering the entire sample, hyposalivation could be observed in 9 cases (37.5%) of non stimulated salivary flow and in 8 cases (33.3%) of stimulated salivary flow, with no statistical difference. Data are summarized in table 5. However, in only 3 cases (12.5%) could the xerostomia and hyposalivation be observed simultaneously. The mean whole of non stimulated salivary flow was 0.65 mL (range 0.03-3.33 mL), while the mean whole stimulated salivary flow was 1.36 (range 0.20-3.67 mL). Slightly higher non stimulated and stimulated salivate flows were observed in men than in women (Figure 1).

No correlations were found between the presence of HCV RNA in the saliva and age, gender, clinical presentation, risk factors of acquired infection, xerostomia or salivary flow (Table 6).

Oral mucosal alterations, including variations of normality and mucosal lesions were observed in 20 patients (83.3%). The most common alterations were traumatic lesions in 8 cases (33.4 %), followed by Fordyce's spots in 6 cases (25.0%), and candidiasis in 4 cases (16.7%). Oral mucosal alterations according to gender and age, as well as the presence of HCV RNA in non stimulated and stimulated saliva samples, showed no statistical significant difference. Oral lichen planus was the only condition that could be related to the chronic hepatitis C ($p < .0001$).

DISCUSSION

As hepatitis C is often asymptomatic or shows no specific manifestation in the acute phase, the WHO estimates that there are millions of undiagnosed HCV-infected people, constituting an important link in the chain of HCV transmission [26].

As expected, the main source of transmission of HCV in the present study was blood transfusion (41.7%), which is in accordance with that reported in the literature [25]. Nevertheless, an important point to be emphasized is that in 4 patients (16.7%) with chronic hepatitis C, the source of infection was unknown. This observation is in accordance with our previous study [13] where we observed a high frequency of patients (34%) in whom the source of HCV infection could not be identified. Epidemiological studies suggest that infection by contact with contaminated saliva is rare because the infective capacity of HCV viral particles in saliva is low, with no evidence to suggest that the virus was spread readily by kissing, sneezing, coughing, food, water, or sharing of eating or drinking utensils [5]. Moreover, some authors have suggested that specific and non-specific defense mechanisms present in saliva could attenuate or abolish the infective capacity of viral particles, as is the case with HIV [10]. However, the intrafamilial propagation of HCV particles in human saliva [23], and their transmission by human bite

have been reported [7]. Despite the small sample in the present study, the frequency of HCV RNA in saliva, observed in our study encourages new research regarding new possible, but still unknown, sources of infection like saliva.

Our results showed that among the 4 patients with an unknown infection route, 2 presented HCV in the NSSF, whereas only 1 remained positive when the SSF was tested. Although our sample does not allow us to draw conclusions, we believe that the saliva may be investigated as a possible infection route of hepatitis C virus in some patient groups. Research to clarify this point is clearly warranted.

HCV RNA was detected in at least one saliva sample in 5 of the 6 patients who presented advanced liver disease (Metavir A2F4). This finding may suggest a possible association between the liver status and the detection of HCV RNA in the saliva.

Dry mouth has been reported in 0 to 35% of chronic hepatitis C patients [3; 9; 14; 15; 28; 34]. Some authors have suggested that HCV is a virus with a triple tropism (hepatotropism, lymphotropism, and sialotropism), which could explain the xerostomia in these patients [29]. The reduced salivary flow rate in hepatitis C patients could be due to infiltration of the salivary gland by the virus [15] or a possible virus induced immune mechanism [32]. In the present study, six (25.0%) of the patients complained of oral dryness (xerostomia); however, only in 3 cases (12.5%) could hyposalivation actually be observed. Moreover, in 9 of 10 patients without xerostomia, the hyposalivation was also detected. Despite the small sample, our results agree with those obtained by Henderson et al [15] and Ferreiro et al [9], who found a weak association between symptoms of dry mouth and hyposalivation. Further research to elucidate this point is needed.

Oral mucosal alterations were observed in almost all evaluated patients with chronic hepatitis C (83.3%). Due to the high global prevalence of chronic hepatitis C, and the potential association between this condition and some oral mucosal conditions [13], we consider periodic oral examination in patients with HCV infection important so as to promote a suitable and full health assistance to these patients.

All patients included in our study presented chronic hepatitis C confirmed by RT-PCR, which is considered the definitive proof of hepatitis C infection [31]. Our results showed the presence of HCV RNA in non stimulated and stimulated saliva samples in 11 patients (45.8%) and in 14 patients (58.3%), respectively, with no statistically significant difference ($p = 0.47$). These findings suggest that both non stimulated and stimulated saliva samples are equally suitable for the investigation of the presence of salivary HCV RNA. The prevalence of HCV RNA in saliva samples in our study was similar to findings from Mariette et al. [22], but the high total prevalence proved to be different from others reported in different countries [10; 11; 16]. Moreover, our results were also higher than the prevalence of 20.5% previously reported in Brazil [12]. The authors attributed this lower prevalence to the use of cell-free saliva. Nonetheless, the higher prevalence observed in this study provides a biological basis for the potential transmission of HCV via contaminated saliva, at least in some cases. However, the issue of intraglandular replication of HCV remains controversial. Some authors found HCV in different tissue samples compatible with independent replication at extrahepatic sites [20], which could include salivary glands [2], suggesting that the HCV was a sialotropic virus [29]. The mechanism by which the virus enters the saliva, its clinical significance, and the possible HCV transmission through exposure to this body fluid, remain unknown. In addition, the extrahepatic tissues might act as a reservoir for HCV, which may produce a profound effect on HCV transmission, morbidity, and treatment [4]. However, the role of HCV and its viral proteins in the pathogenesis of extra hepatic manifestations are still not clear [10].

Some authors suggested that the detection of HCV RNA in saliva may be a consequence of contamination with blood, but positive hemoglobin samples were detected regardless of the salivary HCV RNA results [8]. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) are another possible source for transferring HCV to saliva [8] even though the presence of HCV RNA in PBMCs and in saliva is not closely correlated [37]. HCV

could also enter saliva through the gingival crevicular fluid, as has been shown in other viral diseases [24], but HCV RNA in saliva had already been found even in edentulous patients [32]. Moreover, Liou et al. [21] and Komiyama et al. [19] demonstrated that the presence of blood in saliva samples did not correlate with the presence of HCV RNA in the same saliva samples. As we did not perform specific tests to investigate the presence of blood in the saliva samples, this point deserves further investigation.

No significant correlations were found between the presence of HCV RNA in non stimulated or stimulated saliva samples and age, gender, clinical presentation, risk factors, xerostomia, or non stimulated and stimulated salivary flows. Some studies have suggested that the best predictive factor for HCV detection in saliva was a high level of plasma HCV RNA [8; 16; 22], indicating that the presence of HCV RNA in the saliva could be correlated with the HCV viral load. As variations of plasma HCV RNA levels have been related to co-infection with other viral agents, such as HBV [19] and HIV [33], as well as antiviral therapy [17], patients in these conditions were not included in our study.

To present, it has not been possible to demonstrate any infective capacity of HCV particles detected in saliva. In addition, it has not been confirmed whether these are complete virions or virus fragments, nor whether there is sufficient structural integrity to initiate the HCV life cycle [10]. Furthermore, HCV-specific receptors have not been defined on oral epithelial cells, nor has the role of host defense mechanisms been determined. Studies capable of stimulating HCV replication *in vitro* could be of great use in definitively establishing the significance of HCV RNA particles detected in the saliva in any transmission of HCV infection. Thus, we agree with Amado et al [1] who stated that although the presence of the HCV particles in saliva still can not determine the saliva as a source of infection, the convenience, reliability, and minimal non-invasive nature of this method makes it attractive and adequate for epidemiological surveys of immune status of selected at-risk populations. Moreover, in spite of our small sample, which does not

allow us to conclude about the infectivity status of HCV in the saliva, research regarding this point is clearly warranted, considering the importance of the disease and the frequency, in some series, of patients in whom neither risk factors nor source of HCV infection could be demonstrated.

REFERENCES

- [1] L.A. Amado, L.M. Villar, V.S. De Paula, A.J. De Almeida, A.M. Gaspar, Detection of hepatitis A, B, and C virus-specific antibodies using oral fluid for epidemiological studies. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101 (2006) 149-55.
- [2] J.J. Arrieta, E. Rodríguez-Iñigo, N. Ortiz-Movilla, J. Bartolomé, M. Pardo, F. Manzarbeitia, H. Oliva, D.M. Macías, V. Carreño, In situ detection of hepatitis C virus RNA in salivary glands. *Am J Pathol* 158 (2001) 259-64.
- [3] P. Cacoub, C. Renou, E. Rosenthal, P. Cohen, I. Loury, V. Loustaud-Ratti, A.M. Yamamoto, A.C. Camproux, P. Hausfater, L. Musset, P. Veyssier, G. Raguin, J.C. Piette, Extrahepatic manifestations associated with hepatitis C virus infection: a prospective multicenter study of 321 patients. *Med* 79 (2000) 47-56.
- [4] M. Carrozzo, Oral diseases associated with hepatitis C virus infection. Part 1. sialadenitis and salivary glands lymphoma. *Oral Dis* 14 (2008) 123-30.
- [5] Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV-related chronic disease. 47:1-33.
- [6] S.W. Chan, F. McOmish, E.C. Holmes, B. Dow, J.F. Peutherer, E. Follett, P.L. Yap, P. Simmonds, Analysis of a new hepatitis C virus type and its phylogenetic relationship to existing variants. *J Gen Virol* 73 (1992) 1131-41.
- [7] G.M. Dusheiko, M. Smith, P.J. Scheuer, Hepatitis C virus transmitted by human bite. *Lancet* 336 (1990) 503-504.
- [8] P. Fabris, D. Infantolino, M.R. Biasin, G. Marchelle, E. Venza, V. Terribile Wiel Marin, P. Benedetti, G. Tositti, V. Manfrin, F. de Lalla, High prevalence of HCV RNA in the saliva fraction of patients with chronic hepatitis C but no evidence of HCV transmission among sexual partners. *Infection* 27 (1999) 86-91.
- [9] M.C. Ferreira, M.H. Prieto, S.B. Rodríguez, R.L. Vázquez, A.C. Iglesias, P.D. Dios, Whole stimulated salivary flow in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Oral Pathol Med* 31 (2002) 117-20.
- [10] M.C. Ferreira, P.D. Dios, C. Scully, Transmission of hepatitis C virus by saliva? *Oral Dis* 11 (2005) 230-5.

- [11] M.W. Fried, M. Shindo, T.L. Fong, P.C. Fox, J.H. Hoofnagle, M. Bisceglie, Absence of hepatitis C viral RNA from saliva and semen of patients with chronic hepatitis c. *Gastroenterol* 102 (1992) 1306–1308.
- [12] P.L. Gonçalves, C.B. Cunha, S.C. Busek, G.C. Oliveira, R. Ribeiro-Rodrigues, F.E. Pereira, Detection of hepatitis C virus rna in saliva samples from patients with seric anti-HCV antibodies. *Braz J Infect Dis* 9 (2005) 28-34.
- [13] S.M.C. Grossmann, M.C.F. Aguiar, R. Teixeira, M.A.V. Carmo, Oral lichen planus and chronic hepatitis C: a controversial association. *Am J Clin Pathol* 127 (2007) 800-4.
- [14] J. Haddad, P. Deny, C. Munz-Gotheil, J.C. Ambrosini, J.C. Trinchet, D. Pateron, F. Mal, P. Callard, M. Beaugrand, Lymphocytic sialadnitis of sjogren's syndrome associated with chronic hepatitis C virus liver disease. *Lancet* 339 (1992) 321-32.
- [15] L. Henderson, M. Muir, P.R. Mills, E. Spence, R. Fox, E.A. McCrudden, J. Bagg, Oral health of patients with HCV infection: a pilot study. *Oral Dis* 7 (2001) 271-75.
- [16] M. Hermida, M.C. Ferreira, S. Barral, R. Laredo, A. Castro, P. Diz Dios, Detection of HCV RNA in saliva of patients with hepatitis c virus infection by using a highly sensitive test. *J Virol Methods* 101 (2002) 29-35.
- [17] M. Hisada, T.R. O'brien, P.S. Rosenberg, J.J. Goedert, Virus load and risk of heterosexual transmission of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus by men with hemophilia. The multicenter hemophilia cohort study. *J Infect Dis* 18 (2000) 1475–1478.
- [18] S.B. Jensen, A.M. Pedersen, J. Reibel, B. Nauntofte, Xerostomia and hypofunction of the salivate glands in cancer therapy. *Support Care Cancer* 11 (2003) 207-25.
- [19] K. Komiyama, F. Kawamura, Y. Arakawa, H. Mastuo, N. Hayashi, T. Shikata, I. Moro, Detection of hepatitis C virus (HCV)-RNA in saliva and gastric juice. *Adv Exp Med Biol* 371b (1995) 995-7.
- [20] T. Laskus, M. Radkowski, L.F. Wang, M. Nowicki, J. Rakela, Uneven distribution of hepatitis C virus quasispecies in tissues from subjects with end-stage liver disease: confounding effect of viral adsorption and mounting evidence for the presence of low-level extrahepatic replication. *J Virol* 74 (2000) 1014–1017.
- [21] T.C. Liou, T.T. Chang, K.C. Young, X.Z. Lin, C.Y. Lin, H.L. Wu, Detection of HCV RNA in saliva, urine, seminal fluid, and ascites. *J Med Virol* 37 (1992) 197-202.
- [22] X. Mariette, P. Loiseau, F. Morinet, Hepatitis C virus in saliva. *Ann Intern Med* 122 (1995) 556.
- [23] A.M. Mastromatteo, G.L. Rapaccini, M. Pompili, S. Ursino, V. Romano-Spica, G. Gasbarrini, G. Vanini, Hepatitis C virus infection: other biological fluids than blood may be responsible for intrafamilial spread. *Hepatogastroenterol* 48 (2001) 193-6.
- [24] M. Maticic, M. Poljak, B. Kramar, K. Seme, V. Brinovec, J. Meglic-Volkar, B. Zakotnik, U. Skaleric, Proviral HIV-DNA in gingival crevicular fluid of HIV-1-infected patients in various stages of HIV disease. *J Dent Res* 79 (2000) 1496–1501.

- [25] A.A. Modi, T.J. Liang, Hepatitis C: a clinical review. *Oral Dis* 14 (2008) 10-4.
- [26] National Institutes of Health, Consensus development conference statement: management of hepatitis c: 2002. *Hepatology* 36 (2002) s3-s20.
- [27] G.C. Oliveira, R.A. Carmo, M.O. Rocha, M.O. Silva, A.T. Lima, M.D. Guimarães, R. Corrêa-Oliveira, Hepatitis C virus genotypes in hemophiliacs in the state of Minas Gerais, Brazil. *Transfusion* 39 (1999) 1194-9.
- [28] M. Pirisi, C. Scott, C. Fabris, G. Ferraccioli, G. Soardo, R. Ricci, P. Toniutto, C. Avellini, D. Vitulli, A.M. Miotti, Mild sialoadenitis: a common finding in patients with hepatitis C virus infection. *Scand J Gastroenterol* 29 (1994) 940-2.
- [29] M. Ramos-Casals, M. Garcia-Carrasco, R. Cervera, J. Font, Is hepatitis C virus a sialotropic virus? *Am J Pathol* 159 (2001) 1593-4.
- [30] Relatório do grupo de estudos da sociedade brasileira de hepatologia (1999). Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite crônica pelo vírus c no Brasil. Accessed January 20, 2003. Available from <http://www.sbhepatologia.org.br>.
- [31] D.J. Robbins, V. Pasupuleti, J. Cuan, C.S. Chiang, Reverse transcriptase PCR quantitation of hepatitis C virus. *Clin Lab Sci* 13 (2000) 23-30.
- [32] K.M. Roy, J. Bagg, B. McCarron, T. Good, S. Cameron, A. Pithie, Predominance of HCV type 2a in saliva from intravenous drug users. *J Med Virol* 54 (1998) 271-5.
- [33] E. Sagnelli, N. Coppola, C. Scolastico, P. Filippini, T. Santantonio, T. Stroffolini, F. Piccinino, Virologic and clinical expressions of reciprocal inhibitory effect of hepatitis B, C and delta viruses in patients with chronic hepatitis. *Hepatology* 32 (2000) 1106-1110.
- [34] C.A. Scott, C. Avellini, L. Desinan, M. Pirisi, G.F. Ferraccioli, P. Bardus, C. Fabris, L. Casatta, E. Bartoli, C.A. Beltrami, Chronic lymphocytic sialoadenitis in HCV-related chronic liver disease: comparison of Sjögren's Syndrome. *Histopathol* 30 (1997) 41-8.
- [35] K. Takamatsu, Y. Koyanagi, K. Okita, N. Yamamoto, Hepatitis C virus in saliva. *Lancet* 336 (1990) 1515.
- [36] C. Vitali, S. Bombardieri, R. Jonsson, H.M. Moutsopoulos, E.L. Alexander, S.E. Carsons, T.E. Daniels, P.C. Fox, R.I. Fox, S.S. Kassan, S.R. Pillemer, N. Talal, M.H. Weisman, European Study Group on Classification Criteria for Sjögren's Syndrome. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 61 (2002) 554-8.
- [37] K.C. Young, T.T. Chang, T.C. Liou, H.L. Wu, Detection of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells and in saliva. *J Med Virol* 41 (1993) 55-60.

[38] A.L. Zignego, C. Ferri, S.A. Pileri, P. Caini, F.B. Bianchi, for the italian association of the study of liver commission on extrahepatic manifestations of HCV infection. Extrahepatic manifestations of hepatitis c virus infection: a general overview and guidelines for a clinical approach. *Dig Liver Dis* 39 (2007) 2-17.

Table 1 Demographical data from patients with chronic hepatitis C

Patient	Age (years)	Gender	Time lapsed from diagnosis (in months)	Risk factors	Symptoms	Metavir	Genotype
1	67	Female	3	percutaneous exposure	Absent	**	**
2	43	Female	84	Blood transfusion	Absent	**	**
3	54	Male	12	i.v. drug use	Absent	A1F1	3a
4	58	Female	48	*	Present	A2F4	**
5	29	Male	36	*	Absent	A0F0	**
6	47	Male	24	Blood transfusion	Present	A2F4	**
7	40	Female	1	i.v. drug use	Absent	**	**
8	46	Male	1	Blood transfusion	Absent	**	**
9	46	Male	16	i.v. drug use	Absent	A1F2	**
10	49	Male	96	i.v. drug use	Present	A2F4	**
11	64	Male	7	others	Present	A1F4	1b
12	41	Female	9	others	Absent	**	**
13	73	Female	60	Blood transfusion	Absent	A3F4	**
14	72	Female	48	*	Absent	A1F1	**
15	40	Male	9	others	Absent	**	**
16	49	Female	6	others	Present	**	**
17	60	Male	7	*	Present	A2F4	**
18	63	Female	48	Blood transfusion	Present	**	**
19	62	Female	108	Blood transfusion	Absent	**	**
20	50	Male	144	Blood transfusion	Present	**	**
21	56	Male	16	percutaneous exposure	Absent	A2F4	**
22	26	Female	24	Blood transfusion	Absent	A2F2	1b
23	55	Female	60	Blood transfusion	Present	**	1b
24	67	Female	17	Blood transfusion	Present	A2F4	1b

Legend: i.v – intravenous; * unknown; ** Not tested;

Table 2 Frequency of HCV RNA in saliva from patients with chronic hepatitis C.

HCV RNA in stimulated saliva	HCV RNA in non stimulated saliva		
	Positive <i>n</i> (%)	Negative <i>n</i> (%)	TOTAL <i>n</i> (%)
Positive <i>n</i> (%)	7 (63.6)	7 (53.8)	14 (100.0)
Negative <i>n</i> (%)	4 (45.8)	6 (46.2)	10 (100.0)
TOTAL <i>n</i> (%)	11 (100.0)	13 (100.0)	24 (100.0)

P=0.47 (Fisher's exact test)

Table 3 Frequency of patients with chronic hepatitis C with unknown risk factor, according to the presence of HCV RNA in the saliva

	HCV RNA in non stimulated saliva		HCV RNA in stimulated saliva		TOTAL <i>n</i> (%)
	Positive <i>n</i> (%)	Negative <i>n</i> (%)	Positive <i>n</i> (%)	Negative <i>n</i> (%)	
Total <i>n</i> (%)	2 (50.0)	2 (50.0)	1 (25.0)	3 (75.0)	4 (100.0)

Table 4 Frequency of patients with chronic hepatitis C according to liver status (Metavir) and the detection of HCV RNA in saliva

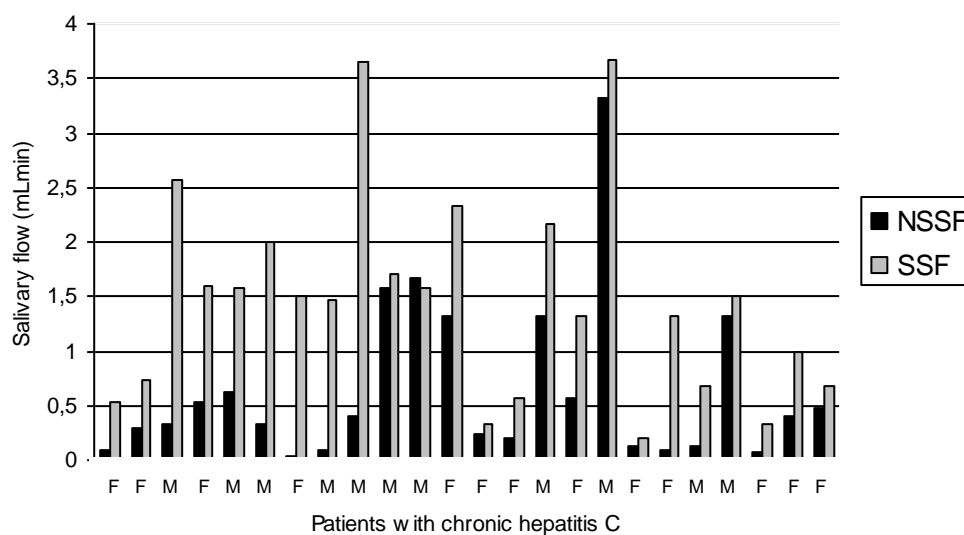
METAVIR	HCV RNA in non stimulated saliva		HCV RNA in stimulated saliva		TOTAL <i>n</i> (%)
	Positive <i>n</i> (%)	Negative <i>n</i> (%)	Positive <i>n</i> (%)	Negative <i>n</i> (%)	
A0F0	1 (100.0)	-	-	1 (100.0)	1 (100.0)
A1F1	-	2 (100.0)	-	2 (100.0)	2 (100.0)
A1F2	1 (100.0)	-	1 (100.0)	-	1 (100.0)
A1F4	-	1 (100.0)	1 (100.0)	-	1 (100.0)
A2F2	-	1 (100.0)	-	1 (100.0)	1 (100.0)
A2F4	5 (83.3)	1 (16.7)	3 (50.0)	3 (50.0)	6 (100.0)
A3F4	-	1 (100.0)	-	1 (100.0)	1 (100.0)
TOTAL	7 (53.8)	6 (46.2)	5 (38.5)	8 (61.5)	13 (100.0)

Table 5 Xerostomia and salivary flow in patients with chronic hepatitis C

XEROSTOMIA	NON STIMULATED SALIVARY FLOW		p	STIMULATED SALIVARY FLOW		p
	Normal <i>n</i> (%)	Hyposalivation <i>n</i> (%)		Normal <i>n</i> (%)	Hyposalivation <i>n</i> (%)	
			0.237			0.680*
Present	5 (33.3)	1 (11.1)		4 (25.0)	2 (25.0)	
Absent	10 (66.7)	8 (88.9)		12 (75.0)	6 (75.0)	
TOTAL <i>n</i> (%)	15 (100.0)	9 (100.0)		16 (100.0)	8 (100.0)	

*Fisher's exact test

Figure 1 Salivary flow in patients with chronic hepatitis C according to gender



Legend: NSSF – non stimulated salivary flow; SSF – stimulated salivary flow; F – female; M – male

Table 6 Frequency of patients with chronic hepatitis C presenting HCV RNA in saliva, according to age, gender, clinical presentation, risk factors, xerostomia, and salivary flow

Variables	HCV RNA in non stimulated saliva			HCV RNA in stimulated saliva		
	Positive <i>n</i> (%)	Negative <i>n</i> (%)	<i>p</i>	Positive <i>n</i> (%)	Negative <i>n</i> (%)	<i>p</i>
AGE			0.646			0.184
< 50 years old	6 (54.5)	7 (55.8)		6 (42.9)	7 (70.0)	
≥ 50 years old	5 (45.5)	6 (46.2)		8 (57.1)	3 (30.0)	
GENDER			0.115			0.184
Female	4 (36.4)	9 (69.2)		6 (42.9)	7 (70.0)	
Male	7 (63.6)	4 (30.8)		8 (57.1)	3 (30.0)	
CLINICAL PRESENTATION			0.223			0.289
Asymptomatic carrier	5 (45.5)	9 (69.2)		7 (50.0)	7 (70.0)	
Symptomatic	6 (54.5)	4 (30.8)		7 (50.0)	3 (30.0)	
RISK FACTORS			0.121*			0.241*
Blood transfusion	4 (36,4)	6 (46,2)		5 (35.7)	5 (50.0)	
i.v. drug use	3 (27,3)	1 (7,7)		3 (21.4)	1 (10.0)	
percutaneous exposure	2 (18,2)	0 (0,0)		1 (7.1)	1 (10.0)	
others	0 (0,0)	4 (30,8)		4 (28.6)	0 (0.0)	
unknown	2 (18,2)	2 (15,4)		1 (7.1)	3 (30.0)	
XEROSTOMIA			0.589			0.494
Present	3 (27.3)	3 (23.1)		3 (21.4)	3 (30.0)	
Absent	8 (72.7)	10 (76.9)		11 (78.6)	7 (70.0)	
NON STIMULATED SALIVARY FLOW			0.300			0.418
Normal	8 (72.7)	7 (53.8)		8 (57.1)	7 (70.0)	
Hyposalivation	3 (27.3)	6 (46.2)		6 (42.9)	3 (30.0)	
STIMULATED SALIVARY FLOW			0.555			0.438
Normal	7 (63.6)	9 (69.2)		10 (71.4)	6 (60.0)	
Hyposalivation	4 (36.4)	4 (30.8)		4 (28.6)	4 (40.0)	

Fisher's exact test; * Chi-square test
Legend: i.v. - intravenous

ARTIGO 4

***(Aceito na revista Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral
Radiology and Endodontology)***

ARTIGO 5

(Submetido para Journal of Clinical Pathology)

Salivary gland disorders in patients with chronic hepatitis C are not associated with the detection of HCV RNA in saliva or salivary glands

Objective: Salivary gland disorders in patients with chronic hepatitis C (CHC) have been considered oral extra hepatic manifestations, reinforcing the HCV as a sialotropic virus. Hence, we investigated the prevalence of HCV RNA in saliva and salivary glands and its possible association with xerostomia, hyposalivation, and sialadenitis in patients with CHC.

Patients and Methods: In 65 patients with confirmed CHC, the HCV RNA was investigated by nested-RT-PCR in saliva samples and minor salivary glands. Xerostomia, hyposalivation, clinical and histopathological evidences of sialadenitis, were also evaluated. Univariate and multivariate analysis were employed to verify associations.

Results: HCV RNA was detected in the saliva of 26/65 (40.0%) patients and in 12/65 (18.5%) salivary glands. Xerostomia was reported by 23/65 (35.4%) patients and hyposalivation was diagnosed in 13/65 (20.0%) patients. Sialadenitis was confirmed by histopathological features in 31/65 (47.7%) patients. Twelve (38.7%) of the 31 patients with sialadenitis presented HCV RNA in saliva and 2/31 (6.5%) in salivary glands. No associations were found between xerostomia, hyposalivation or sialadenitis and the detection of HCV RNA in saliva or in salivary glands.

Conclusions: Although xerostomia, hyposalivation, and sialadenitis are frequent findings in CHC patients, our study did not confirm the association between the detection of HCV RNA in saliva or salivary glands with these salivary gland disorders. However, an indirect role of HCV by immune-mediated virus mechanisms in the pathogenesis of salivary gland disorders in this group of patients cannot be ruled out.

Key words: hepatitis C; HCV; salivary gland; sialadenitis.

INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV) has been considered the main cause of chronic liver disease, and HCV infection represents one of the major public health issues worldwide¹. Many extra hepatic manifestations (EHM) associated with HCV infection have been reported in patients with chronic liver disease². Cacoub et al. suggested that aging, female sex and advanced liver fibrosis are risk factors for development of EHM³.

According to some authors, about 70% of the HCV-infected patients present at least one EHM during the course of the infection, such as salivary gland disorders and lichen planus³. The association between salivary gland disorders and HCV infection was first reported by Haddad et al., in 1992, when the authors described sialadenitis in 57.0% of HCV patients and suggested an autoimmune mechanism to explain the lymphocytic infiltration in salivary glands⁴. In addition, HCV virus appears to trigger a lymphocytic infiltration resembling Sjögren's Syndrome (SS)⁵. As clinical evidences of dry mouth or dry eyes in HCV-infected patients is rare, even in the presence of lymphocytic infiltration, the term SS-secondary to HCV has been proposed⁶.

Xerostomia is common in patients with chronic hepatitis C, with prevalence ranging from 10% to 35%^{7,8}. Therefore, the volume of saliva has been used to identify dysfunction of salivary glands in patients with chronic hepatitis C^{6,8,9}. Reported prevalence of hyposalivation in chronic hepatitis C patients ranges from 13% and 33%, although a weak association between xerostomia and salivary gland hypofunction in HCV patients has been suggested^{8,10-12}. In addition, further data have shown that up 80% of HCV-infected individuals may have some form of salivary abnormalities, mainly histological mild sialadenitis^{4,13}. Even though HCV is considered a sialotropic virus by some authors^{14,15}, it is controversial if xerostomia and sialadenitis in patients with chronic hepatitis C is directly related to HCV or not^{5,16}. Hence, we investigated the prevalence of HCV RNA in saliva and in minor salivary glands and its possible

association with xerostomia, hyposalivation, and sialadenitis in Brazilian patients with chronic hepatitis C.

PATIENTS AND METHODS

A cross-sectional survey was carried out on 65 HCV patients (anti-HCV positive, Elisa III, HCV RNA positive) prospectively admitted to the Viral Hepatitis Reference Center of the Alfa Institute of Gastroenterology at the Clinical Hospital of Universidade Federal de Minas Gerais (AHEV/IAG-HC/UFGM), Belo Horizonte, Brazil. Patients with human immunodeficiency virus (HIV-1/2) and hepatitis B virus (HBV) coinfection or receiving antiviral treatment for hepatitis C were excluded.

Demographical data, medical history, alcohol intake, stage of liver fibrosis (METAVIR), and viral load were assessed in medical records. Significant liver disease (ALD) was considered as fibrosis stage ≥ 2 (METAVIR), and high HCV viral serum load more than 800.000 IU/mL by RNA quantitative test. Intra-oral examination was performed to investigate oral alterations.

Xerostomia

Patients were asked about the symptom of dry mouth (xerostomia) and, if present, they were treated with artificial saliva gel (Oral Balance- Biotene®).

Saliva samples

Patients refrained from oral hygiene, eating, drinking, and smoking 60 minutes before non-stimulated salivary flow (NSSF) and stimulated salivary flow (SSF) collection in sterile 50 mL Falcon tubes. First, the NSSF produced in three minutes was collected, and rates ≤ 0.1 ml/min were considered as hyposalivation. Next, patients were asked to chew a sterile rubber cylinder for three minutes before spitting out saliva to measure SSF. Rates ≤ 0.7 ml/min were considered as hyposalivation¹⁷. Following this, saliva samples were visually analyzed for the presence of blood and immediately stored at -80°C .

Salivary gland samples

Two samples of minor salivary glands of the lower lip were collected under local anesthesia. One sample was fixed in 10% formaldehyde for standard paraffin technique, and the other was kept in RNA-later at 4°C overnight, and stored at -20°C thereafter.

Investigation of HCV RNA in saliva and salivary glands

The RNA was extracted from saliva by the commercial viral RNA isolation kit (Qiaamp, Qiagen, Hilden Germany) following manufacturer's instructions. Nested RT-PCR was carried¹⁸, through the amplification of 251 bp fragment from the 5' UTR region of the HCV, applying a minor adaptation introduced by Oliveira et al.¹⁹. Briefly, single-strand cDNA was synthesized from 18 µL of the RNA sample at 42°C for 50 minutes with 200 U of reverse transcriptase (Superscript II, GIBCO, BRL, Rockville, MD, USA) in 30 µL of manufacturer supplied buffer containing 10 pmole of primer 209 (ATACTCGAGGTGCACGGGTCTACGAGACCT), 10 mM of each dNTP, and 10nM of dithiothreitol. For the first-round of PCR, 2 µL of cDNA were added to a mixture containing 2 µL of 10x of the supplied PCR buffer, 5 mM of MgCl₂, 10 mM of each dNTP, 10 pmole of primers 939 (CTGTGAGGAACTACTGTCTT) and 209, and 5U of Taq DNA polymerase (GIBCO/ BRL). The mixture was cycled 30x in a thermocycler (Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400) at 95°C for 5 minutes, 95°C for 1 minute, 50°C for 1 minute, 72°C for 1 minute, and repeated at 72° C for 1 minute. The second-round of PCR (nested) was carried out as above, using primers 940 (TTCACGCAGAAAGGGTCTAG) and 211 (CACTCTCGGAGCACCCCTATCAGGCAGT) as well as 1.5U of Taq polymerase.

After the complete crushing of the salivary glands, the RNA extraction was performed using a commercial viral RNA isolation kit (RNAeasy Mini Handbook, Qiagen). Nested RT-PCR was carried out similarly to the saliva samples, as previously described. The PCR products were electrophoresed in a 6% polyacrylamide gel, using a

vertical electrophoresis apparatus (Model S2 Life Technologies Inc.) and stained with silver nitrate. The banding pattern was visualized and analyzed as described by McOmish et al.²⁰.

Histological evaluation

Three serial sections of 4µm of salivary gland were obtained for standard staining with haematoxylin and eosin. The glandular architecture and inflammatory cells were carefully examined by the pathologist investigator. The inflammatory infiltration was classified according to its distribution in the tissue as diffuse, when a distinct pattern could not be observed, or focal, when the inflammatory cells formed aggregates. A 'focus' was defined as aggregates of 50 or more lymphocytes and histiocytes, usually with a few plasma cells placed peripherally²¹. The total number of inflammatory cells were also classified as mild, moderate, and severe²² and according to the predominant cellular type (lymphocytes, plasm cells or both).

Statistical analysis and ethical aspects

The Chi-square and Fisher's tests were used for univariate analysis by EPIINFO 3.4.3. Multivariate analysis was performed by logistic regression using the software STATA (version 10). A *p* value ≤ 0.05 was considered significant. The study was approved by the UFMG Ethical Committee in Surveys, and all volunteers signed the informed consent form before inclusion.

RESULTS

Thirty-five (53.8%) males and 30 (46.2%) females, mean age of 53.0 years (range 14-79 years) were included. Blood transfusion was the most prevalent risk factor for HCV infection, reported by 29 (44.6%) patients. In nine (13.8%), the risk factor could not be determined. Fifty patients (76.9%) did liver biopsy per clinical protocol, and 21/50 (42.0%) patients had significant liver disease (Metavir ≥2). In 24 (36.8%) patients with

HCV viral serum load assessed, eight (33.3%) presented high viral load (HCV RNA \geq 800.000 IU/mL).

HCV RNA was detected in saliva of 26 (40.0%) patients and in 12 (18.5%) salivary glands. In six (9.2%) cases, HCV RNA was detected in saliva and salivary gland samples, simultaneously. Among patients with ALD, in 11/21 (52.4%) HCV RNA was detected in saliva and in 4/21 (19.0%) in salivary glands (with no significant differences) (Table 1). Figure 1 and 2 illustrate typical HCV RNA positive and negative RT-PCR products. HCV RNA could be identified in saliva of 5/8 (62.5%) patients and in salivary gland of 2/8 (25.0%) patients with high serum viral load.

Twenty three (35.4%) patients complained of xerostomia. As in most patients with xerostomia the HCV RNA was not detected ($p = 0.014$), an association between HCV RNA in saliva and xerostomia was not confirmed (Table 2). Moreover, only 2/23 (8.7%) patients had HCV RNA positive in saliva and salivary glands, simultaneously.

Seven out of 23 (30.4%) patients reported use of antihypertensive and 3/23 (13.0%) antidepressant drugs. No association was found among xerostomia, HCV RNA in salivary gland, high viral serum load, age, gender and use of antihypertensive or antidepressant drugs.

Hyposalivation was disclosed in 13 (20.0%) patients. HCV RNA was positive in 7/13 (53.8%) saliva and in 4/13 (30.8%) salivary glands of patients with hyposalivation (Table 2). Five out of 65 (7.7%) patients showed concomitant xerostomia and hyposalivation, and in one (20.0%) patient, HCV RNA was positive in saliva and in salivary gland (without statistical significance).

Histological sialadenitis was diagnosed in 31 (47.7%) patients, being all asymptomatic. Sialadenitis was diffuse in 19 (61.3%) cases and focal in 12 (38.7%) cases (Figure 3). The inflammatory infiltration consisted mainly of lymphocytes in 19 (61.3%) samples, plasm cells in 10 (32.3%) cases and both in 2 (6.4%) cases. Diffuse

inflammatory infiltration was classified as mild in 12/19 (63.2%), moderate in 6/19 (31.6%), and severe in 1/19 (5.2%) patients. In 10/12 (83.3%) cases with focal inflammatory pattern, lymphocytes were the predominant cells (Table 3). Acinar necrosis was observed in 9/31 (29.0%) cases of sialadenitis. In patients with sialadenitis, HCV RNA was detected in 12/31 (38.7%) salivary samples and 3/31 (9.7%) salivary glands, without statistical significance.

Two out of 65 (3.1%) patients presented with simultaneous xerostomia, hyposalivation and sialadenitis, but HCV RNA was negative in saliva and in salivary gland from both. No statistical correlation among presence, distribution or type of inflammatory infiltration with detection of HCV RNA in saliva or salivary glands was observed. In addition, as in most patients with sialadenitis, the HCV RNA was not detected in salivary gland ($p=0.046$) (Table 2), sialadenitis as a consequence of HCV virus infection of saliva or salivary gland was not confirmed.

Seven out of 21 (33.3%) patients with Significant liver disease complained of xerostomia, 6 (28.6%) presented hyposalivation and 8/21 (38.1%) had histological diagnosis of sialadenitis. In 2/21 (9.5%) patients, the xerostomia, hyposalivation and sialadenitis were observed, simultaneously. Only one patient out of 21 (4.8%) had both HCV RNA positive in saliva and salivary gland. Significant liver disease was not related to xerostomia, hyposalivation, sialadenitis or HCV RNA in saliva or salivary glands.

The most prevalent variations of normal oral mucosal conditions present in 49 (75.4%) patients were Fordyce's spots in 12 (18.5%) cases, and lingual varicosities in 9 (13.8%) cases. Candidiasis was observed in 9 (13.8%) cases, traumatic lesions in 7 (10.8%) cases, and lichen planus in 6 (9.2%) cases.

DISCUSSION

As chronic hepatitis C is often asymptomatic, the WHO estimates that there are millions of undiagnosed HCV-infected people, constituting an important link in the chain

of HCV transmission²³. The main source of HCV acquisition in our study, previous blood transfusion (44.6%), is in accordance with the literature^{24,25}. Nevertheless, of critical importance is the fact that in 9 patients (13.8%), the source of HCV infection was unknown, as pointed out by others studies^{26,27}. As HCV has been considered a sialotropic virus, and HCV RNA can be detected in saliva and salivary glands, these findings give support to clinical investigations about novel possible sources of infection.

Several EHM have been reported in patients with chronic hepatitis C, and some can be the first signal of HCV infection²⁸. Some authors suggest that extra hepatic tissues might act as reservoir for HCV²⁷ and that the virus has a triple tropism: hepatotropism, lymphotropism, and sialotropism¹⁴. However, the role of HCV and its viral proteins in the pathogenesis of extra hepatic manifestations is still unclear.

In our study, the HCV RNA was more often detected in the saliva samples (29.2%) than in the salivary glands (18.5%). It has been advocated that the presence of HCV RNA in saliva may be secondary to contamination through serum transudation of blood^{29,30}. Although specific tests to investigate the presence of occult blood or the presence of PBMCs in saliva and in salivary glands samples were not objective of this study, our findings, in conjunction with suggested by others, give support to the hypothesis that HCV detection in saliva and in salivary glands is not related to oral health conditions³¹⁻³⁴.

We did not find any association of high serum HCV viral load and detection of HCV in saliva. This is a controversial issue as high viral load has been largely associated with the detection of HCV in saliva by some authors^{35,36}, although not been confirmed by others³⁷. It is important to emphasize that these data were available only for 24 patients. Thus, this finding has to be considered with cautions. Moreover, in our study, the detection of HCV RNA in saliva and in salivary glands was not associated with xerostomia, hyposalivation and sialadenitis. Thus, the consequences of HCV RNA

detected in the saliva and salivary glands and its clinical significance remain to be clarified.

As xerostomia, hyposalivation, and sialadenitis were frequent in our group of HCV patients, with prevalence of 35.4%, 13.8% and 47.7%, respectively, similar to previous reports^{4,8,38}, these findings support the hypothesis that salivary gland disorders can manifest as EHM in patients with CHC. However, the lack of association among these oral disturbances and the detection of HCV RNA in saliva and salivary glands raises questions about the sialotropism of HCV and its direct action in the pathogenesis of salivary gland disorders in patients with CHC. On the other hand, our results do not allow us to rule out a possible indirect action of HCV, like immune virus induced salivary gland alterations. We consider important to observe that although older patients can develop xerostomia even in the absence of any disease, and xerostomia has also been associated with several drugs we did not observed these associations.

Concerning the cases of sialadenitis, although in 12 (38.7%) cases the pattern of inflammatory infiltration was compatible with SS, none of the patients presented clinical evidence of the syndrome. Thus, our results are in accordance with the terminology SS-secondary to hepatitis C adopted in the literature²⁹.

Whereas the hypothesis needs further investigation, the association between significant liver fibrosis and higher prevalence of HCV in saliva and salivary glands is suggested here, although without statistical significance. Thus, cross-sectional studies including larger groups of patients with distinct stages of fibrosis will help to clarify this interesting issue. Even though a cross-sectional studies design determines the prevalence of diseases in a population, it is not suitable for establishing the disease incidence and, as a consequence, a definitive correlation will be difficult to be proved.

Among patients with significant liver disease, only 33.3% complained by xerostomia, 28.6% presented hyposalivation and 38.1% showed histological diagnosis of sialadenitis. Together, these conditions were detected simultaneously in only 1 (4.8%)

patient with positive HCV in saliva and salivary gland and was not associated with the severity of hepatic disease. Although these findings are in accordance with others³⁴, further investigations, including larger cohorts, are required to clarify this important concern.

The fact that oral mucosal conditions were highly prevalent in patients with chronic hepatitis C, similar to previous authors^{25,39}, emphasizes the importance of periodic oral examination in patients with CHC to promote suitable and full health assistance to these patients.

CONCLUSION

Although the presence of HCV RNA in saliva and in salivary glands could not be associated with salivary gland disorders in our study, more investigations about the sialotropism of HCV as well as the direct role of virus in these alterations are warranted in order to clarify this intriguing issue. However, an indirect role of HCV by immune-mediated virus mechanisms in the pathogenesis of salivary gland disorders in this group of patients cannot be ruled out.

REFERENCES

1. **Ghany MG**, Strader DB, Thomas DL, *et al.* American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* 2009; **49**:1335-74.
2. **Zignego AL**, Craxì A. Extrahepatic manifestations of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2008; **12**:611-36.
3. **Cacoub P**, Renou C, Rosenthal E, *et al.* Extrahepatic manifestations associated with hepatitis C virus infection: a prospective multicenter study of 321 patients. *Medicine* 2000; **79**:47-56.
4. **Haddad J**, Deny P, Munz-Gotheil C, *et al.* Lymphocytic sialadnitis of sjogren's syndrome associated with chronic hepatitis C virus liver disease. *Lancet* 1992; **339**:321-32.

5. **Nagao Y**, Hanada S, Shishido S, *et al.* Incidence of Sjögren's syndrome in Japanese patients with hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol.* 2003; **18**:258-66.
6. **Ramos-Casals M**, Font J. Extrahepatic manifestations in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Curr Opin Rheumatol.* 2005; **17**:447-55.
7. **Fried MW**, Shindo M, Fong TL, *et al.* Absence of hepatitis C viral RNA from saliva and semen of patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterol.* 1992; **102**:1306–8.
8. **Ferreiro MC**, Prieto MH, Rodríguez SB, *et al.* Whole stimulated salivate flow in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Oral Pathol Med* 2002; **31**:117-20.
9. **Henderson L**, Muir M, Mills PR, *et al.* Oral health of patients with HCV infection: a pilot study. *Oral Dis.* 2001; **7**:271-75.
10. **Boscagli A**, Hatron PY, Canva-Delcambre V, *et al.* Sicca syndrome and hepatitis C virus infection: a Gougerot-Sjögren pseudo-syndrome? *Rev Med Interne.* 1996; **17**:375-80.
11. **Hay EM**, Thomas E, Pal B, *et al.* Weak association between symptoms and objective testing for dry eyes and dry mouth: results from a population based study. *Ann Rheum Dis.* 1998; **57**:20–4.
12. **Verbaan H**, Carlson J, Eriksson S, *et al.* Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C infection and the interrelationship between primary Sjögren's syndrome and hepatitis C in Swedish patients. *J Intern Med.* 1999; **245**:127-32.
13. **Loustaud-Ratti V**, Riche A, Liozon E, *et al.* Prevalence and characteristics of Sjögren's syndrome or Sicca syndrome in chronic hepatitis C virus infection: a prospective study. *J Rheumatol.* 2001; **28**:2245-51.
14. **Ramos-Casals M**, Garcia-Carrasco M, Cervera R, *et al.* Is hepatitis C virus a sialotropic virus? *Am J Pathol* 2001; **159**:1593-4.
15. **Ramos-Casals M**, Muñoz S, Zerón PB. Hepatitis C virus and Sjögren's syndrome: trigger or mimic? *Rheum Dis Clin North Am.* 2008; **34**:869-84.
16. **Ohoka S**, Tanaka Y, Amako Y, *et al.* Sialadenitis in patients with chronic hepatitis C is not directly related to hepatitis C virus. *Hepatol Res.* 2003; **27**:23-29.

17. **Jensen SB**, Pedersen AM, Reibel J, *et al.* Xerostomia and hypofunction of the salivary glands in cancer therapy. *Support Care Cancer* 2003; **11**:207-25.
18. **Chan SW**, McOmish F, Holmes EC, *et al.* Analysis of a new hepatitis C virus type and its phylogenetic relationship to existing variants. *J Gen Virol* 1992; **73**:1131-41.
19. **Oliveira GC**, Carmo RA, Rocha MO, *et al.* Hepatitis C virus genotypes in hemophiliacs in the state of Minas Gerais, Brazil. *Transfusion* 1999; **39**:1194-9.
20. **McOmish F**, Yap PL, Dow BC, *et al.* Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. *J Clin Microbiol* 1994; **32**:884-92.
21. **Waterhouse JP**, Doniach I. Post-mortem prevalence of focal lymphocytic adenitis of the submandibular salivary gland. *J Pathol Bacteriol.* 1966; **91**:53-64.
22. **Chisholm DM**, Mason DK. Labial salivary gland biopsy in Sjogren's disease. *J Clin Path* 1968; **21**:656-660.
23. **Modi AA**, Liang TJ. Hepatitis C: a clinical review. *Oral Dis* 2008; **14**:10-4.
24. **Vieira M**, Freire R, Mangualde J, *et al.* Hepatite C - casuística da consulta de hepatologia de um hospital distrital. *J Port Gastrenterol* 2007; **14**:134-140.
25. **Grossmann SMC**; Teixeira R; Aguiar MC; *et al.* Oral mucosal conditions in chronic hepatitis C Brazilian patients: a cross-sectional study. *J Public Health Dent.* 2009; **69**:168-175.
26. **Moorthy M**, Daniel HD, Kurian G, *et al.* An evaluation of saliva as an alternative to plasma for the detection of hepatitis C virus antibodies. *Indian J Med Microbiol.* 2008; **26**:327-32.
27. **Blackard JT**, Kemmer N, Sherman KE. Extrahepatic replication of HCV: insights into clinical manifestations and biological consequences. *Hepatology* 2006; **44**:15-22.
28. **Carrozzo M**. Oral diseases associated with hepatitis C virus infection. Part 1. Sialadenitis and salivary glands lymphoma. *Oral Dis* 2008; **14**:123-30.

29. **Scott CA**, Avellini C, Desinan L, *et al.* Chronic lymphocytic sialoadenitis in HCV-related chronic liver disease: comparison of Sjögren's Syndrome. *Histopathol* 1997; **30**:41-8.
30. **Laskus T**, Radkowski M, Wang LF, *et al.* Uneven distribution of hepatitis C virus quasispecies in tissues from subjects with end-stage liver disease: confounding effect of viral adsorption and mounting evidence for the presence of low-level extrahepatic replication. *J. Virol* 2000; **74**:1014–1017.
31. **Liou TC**, Chang TT, Young KC, *et al.* Detection of HCV RNA in saliva, urine, seminal fluid, and ascites. *J Med Virol* 1992; **37**:197-202.
32. **Komiyama K**, Kawamura F, Arakawa Y, *et al.* Detection of hepatitis C virus (HCV)-RNA in saliva and gastric juice. *Adv Exp Med Biol* 1995; **371b**:995-7.
33. **Maticic M**, Poljak M, Kramar B, *et al.* Detection of hepatitis C virus RNA from gingival crevicular fluid and its relation to virus presence in saliva. *J Periodontol* 2001; **72**:11-6.
34. **Lins L**, Almeida H, Vitvisk L, *et al.* Detection of hepatitis C virus RNA in saliva is not related to oral health status or viral load. *J Med Virol.* 2005; **77**:216-20.
35. **Sagnelli E**, Coppola N, Scolastico C, *et al.* Virologic and clinical expressions of reciprocal inhibitory effect of hepatitis B, C and delta viruses in patients with chronic hepatitis. *Hepatol* 2000; **32**: 1106–1110.
36. **Wang CC**, Morishima C, Chung M, *et al.* High serum hepatitis c virus (HCV) RNA load predicts the presence of HCV RNA in saliva from individuals with chronic and acute HCV infection, published in *J Infect Dis* 2006, **193**:672-6.
37. **Pawlotsky JM**, Ben Yahia M, Andre C, *et al.* Immunological disorders in C virus chronic active hepatitis: a prospective case-control study. *Hepatology.* 1994; **19**:841-8.
38. **Jorgensen C**, Legouffe MC, Perney P, *et al.* Sicca syndrome associated with hepatitis C virus infection. *Arthritis Rheum.* 1996; **39**:1166-71.
39. **Grossmann SMC**, Aguiar MCF, Teixeira R, *et al.* Oral lichen planus and chronic hepatitis C: a controversial association. *Am J Clin Pathol.* 2007; **127**:800-4.

Table 1 – Prevalence of HCV RNA in saliva and salivary gland samples according to demographical and medical data of chronic hepatitis C patients.

	SALIVA		<i>p</i>	SALIVARY GLAND		Total n (%)
	Positive n (%)	Negative n (%)		Positive n (%)	Negative n (%)	
SEX			0.069			0.268
Female	9 (13.8)	21 (32.3)		7 (10.8)	23 (35.3)	30 (46.2)
Male	17 (26.2)	18 (27.7)		5 (7.7)	30 (46.2)	35 (53.8)
TOTAL n (%)	26 (40.0)	39 (60.0)		12 (18.5)	53 (81.5)	65 (100.0)
RISK FACTOR			0.211			0.848
Blood transfusion	8 (12.4)	21 (32.3)		5 (7.7)	24 (36.9)	29 (44.6)
i.v. drug use	4 (6.1)	2 (3.1)		2 (3.1)	4 (6.1)	6 (9.2)
Percutaneous exposure	3 (4.6)	6 (9.2)		2 (3.1)	7 (10.8)	9 (13.9)
Transplantation	4 (6.1)	2 (3.1)		1 (1.5)	5 (7.7)	6 (9.2)
Others	5 (7.7)	1 (1.5)		0 (0)	6 (9.2)	6 (9.2)
Unknown	2 (3.1)	7 (10.8)		2 (3.1)	7 (10.8)	9 (13.9)
TOTAL n (%)	26 (40.0)	39 (60.0)		12 (18.5)	53 (81.5)	65 (100.0)
Fibrosis grade			0.485			0.435
F0	3 (6.0)	10 (20.0)		1 (2.0)	12 (24.0)	13 (26.0)
F1	6 (12.0)	10 (20.0)		3 (6.0)	13 (26.0)	16 (32.0)
F2	2 (4.0)	2 (4.0)		1 (2.0)	3 (6.0)	4 (8.0)
F3	3 (6.0)	4 (8.0)		0 (0.0)	7 (14.0)	7 (14.0)
F4	6 (12.0)	4 (8.0)		3 (6.0)	7 (14.0)	10 (20.0)
TOTAL n (%)	20 (40.0)	30 (60.0)		8 (16.0)	42 (84.0)	50 (100.0)

i.v.: intravenous; n: absolute number; (%) frequency

Table 2 – Prevalence of HCV RNA in saliva and salivary gland samples according to xerostomia, hyposalivation and sialadenitis of chronic hepatitis C patients.

	SALIVA		p	SALIVARY GLAND		p	Total n (%)
	Positive	Negative		Positive	Negative		
	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)		
Xerostomia			0.014*			0.315	
Present	5 (7.7)	18 (27.7)		3 (4.6)	20 (30.8)		23 (35.4)
Absent	21 (32.3)	21 (32.3)		9 (13.8)	33 (50.8)		42 (64.6)
Total n (%)	26 (40.0)	39 (60.0)		12 (18.5)	53 (81.5)		65 (100.0)
Hyposalivation			0.139			0.119	
Present	7 (10.8)	6 (9.2)		4 (6.2)	9 (13.8)		13 (20.0)
Absent	19 (29.2)	33 (50.8)		8 (12.3)	44 (67.7)		52 (80.0)
Total n (%)	26 (40.0)	39 (60.0)		12 (18.5)	53 (81.5)		65 (100.0)
Sialadenitis			0.422			0.046*	
Present	12 (18.5)	19 (29.2)		3 (4.6)	28 (43.1)		31 (47.7)
Absent	14 (21.5)	20 (30.8)		9 (13.8)	25 (38.4)		34 (52.3)
Total n (%)	26 (40.0)	39 (60.0)		12 (18.5)	53 (81.5)		65 (100.0)

n: absolute number; (%) frequency; * statistically significant

Table 3 – Distribution and quantification of inflammatory infiltrate in salivary gland samples according to the main cell type.

MAIN CELL TYPE	DISTRIBUTION		QUANTIFICATION			TOTAL n (%)
	Diffuse n (%)	Focus n (%)	Mild n (%)	Moderate n (%)	Severe n (%)	
Lymphocyte	9 (29.1)	10 (32.2)	4 (21.1)	4 (21.1)	1 (5.3)	19 (61.3)
Plasm cell	10 (32.2)	0 (0.0)	8 (42.1)	2 (10.5)	0 (0.0)	10 (32.3)
Lymphocyte and plasm cell	0 (0.0)	2 (6.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (6.4)
TOTAL	19 (61.3)	12 (38.7)	12 (63.2)	6 (31.6)	1 (5.2)	31 (100.0)

n: absolute number; (%) frequency

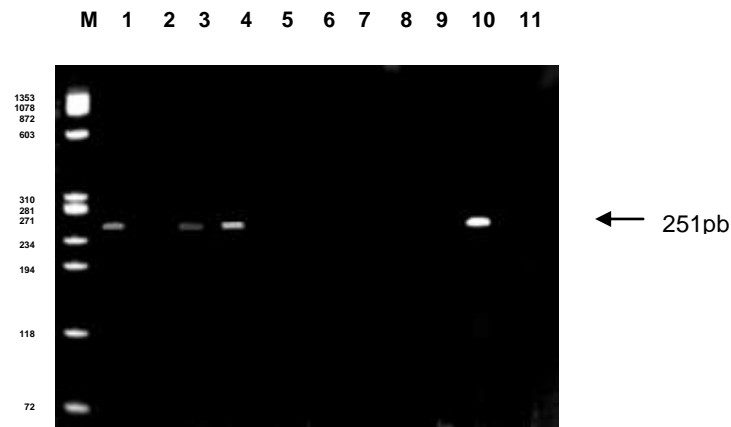


Figure 1 - Nested RT-PCR products of saliva samples collected of the chronic hepatitis C patients. **Lane M**, PhiX174/ Hae III marker; **lanes 1, 3 and 4**, saliva HCV positive; **lanes 2, 5, 6, 7, 8 and 9**, saliva HCV negative; **lane 10**, saliva HCV positive control; **lane 11** saliva HCV negative control.



Figure 2 - Nested RT-PCR products of salivary glands samples collected of chronic hepatitis C patients. **Lane M**, PhiX174/ Hae III marker; **lanes 1, 5 and 6**, salivary gland HCV positive; **lanes 2, 3, 4, 7, 8 and 9**, salivary gland HCV negative; **lane 10**, salivary gland HCV positive control; **lane 11** salivary gland HCV negative control.

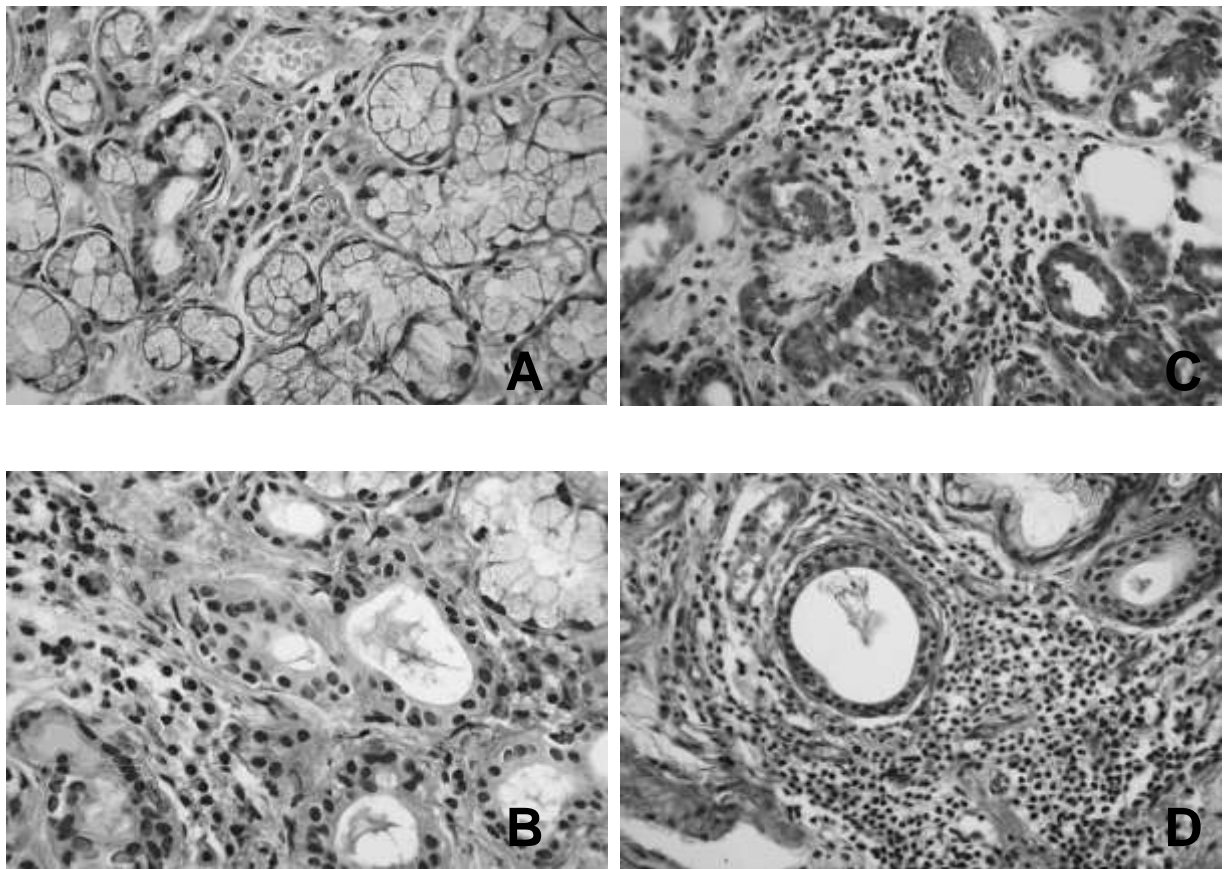


Figure 3 – Histopathological features of sialadenitis in chronic hepatitis C patients: **(A)** mild, **(B)** moderate (magnification x 400), **(C)** severe, **(D)** or in focus (magnification x 200)-(hematoxylin-eosin [HE]).

7. Considerações finais

Investigações direcionadas ao estudo de fatores ligados à patogênese do HCV justificam-se pela atual importância clínica da hepatite C no contexto mundial.

As principais formas de aquisição da doença são bem estabelecidas, como transfusões sanguíneas e uso de drogas intravenosas ilícitas. Entretanto, em muitos pacientes infectados pelo HCV não é possível determinar a forma de contágio pelo vírus. Embora não tenha sido objetivo do estudo a investigação da capacidade de transmissão do HCV através da saliva, a detecção viral em 39% das amostras suscita a necessidade de estudos que possam elucidar a relevância clínica desses achados, uma vez que múltiplos fatores estão implicados na infectividade dos fluidos corporais, incluindo a presença de partículas virais intactas, a carga viral e a presença de células alvo apropriadas no hospedeiro não infectado.

Diferentes manifestações extra-hepáticas (MEH) podem fazer parte do quadro da hepatite C crônica, como o líquen plano e a sialoadenite. Especula-se a atuação do HCV nas diferentes manifestações extra-hepáticas bucais por efeito direto do HCV no tecido infectado ou por uma ação indireta a partir de mecanismos imunes induzidos pelo vírus. Sobretudo, a detecção do HCV em tecidos epiteliais de pacientes com líquen plano bucal e em tecidos de glândulas salivares descrita na literatura, sugere tecidos extra-hepáticos como reservatórios do HCV podendo acarretar efeitos na transmissão e morbidade da doença.

Resultados conflitantes sobre a presença do HCV RNA na saliva e em glândulas salivares dos pacientes com hepatite C crônica têm sido relatados na literatura. Adicionalmente, tem-se sugerido que o HCV teria um triplo tropismo (hepatotropismo, linfotropismo e sialotropismo), embora o mecanismo e a importância clínica associada à patogênese viral ainda não sejam bem estabelecidos.

As alterações de glândulas salivares, como xerostomia, hipossalivação e sialoadenite, foram frequentes no grupo estudado, mas não puderam, entretanto, ser

associadas à presença do HCV RNA na saliva ou na glândula salivar. Esse achado nos remete à hipótese de que, se as alterações de glândulas salivares são, de fato, manifestações extra-hepáticas da hepatite C, talvez essas alterações possam ser consequência de mecanismos indiretos imune-induzidos pelo vírus.

Embora o Consenso Americano e Europeu, de 2002, tenha como critério de exclusão, para o diagnóstico de Síndrome de Sjögren (SS), a hepatite C, muitos casos de sialoadenite, diagnosticados histologicamente nos nossos pacientes, são similares aos encontrados nos casos de SS, embora nenhum apresentasse sinais ou sintomas clínicos compatíveis com a síndrome. Assim sendo, nossos achados estão em consonância com a nomenclatura de SS-secundária à hepatite C, já sugerida na literatura, para esse grupo de pacientes.

Os resultados do presente estudo também mostram evidências, embora não estatisticamente significantes, de uma possível correlação entre o estágio da doença hepática e a detecção viral na saliva, uma vez que o HCV RNA foi detectado mais frequentemente na saliva de pacientes com fibrose hepática avançada. Embora alguns autores tenham sugerido que cargas virais altas no plasma poderiam estar associadas à maior prevalência de detecção do HCV RNA na saliva, nosso estudo juntamente com outros não demonstraram esse achado, do ponto de vista estatístico, embora muitos dos pacientes positivos para o HCV RNA na saliva mostrassem carga viral sérica alta. Visto que a hepatite C crônica é uma doença progressiva, estudos longitudinais podem ser fundamentais no esclarecimento desse achado.

Nosso estudo incluiu a maior amostragem de pacientes já descrita na literatura, até o momento, sendo representativa da população de pacientes com hepatite C do maior centro de referência da área no Estado de Minas Gerais. Assim sendo, os resultados mostrados devem ser fortemente considerados. Evidenciam, ainda, que diversas lacunas sobre a detecção do HCV na saliva e em glândulas salivares e as alterações de glândulas salivares precisam ainda ser preenchidas. Embora estudos

transversais determinem prevalências de doenças em dadas populações, não estabelecem, definitivamente, associações entre doenças. Assim sendo, trabalhos utilizando outros desenhos metodológicos poderiam ser efetivamente importantes para a confirmação dos resultados apresentados aqui.

A maioria dos pacientes avaliados apresentava alguma alteração da mucosa bucal, incluindo-se os processos patológicos e as variações de normalidade, sendo somente o líquen plano bucal associado com a infecção pelo HCV. Embora algumas dessas alterações de mucosa possam não ter relação efetiva com a doença hepática do paciente, muitas dessas doenças são graves, como o pênfigo vulgar. Esses achados, ocasionais ou não, enfatizam a necessidade de exames intra-bucais periódicos nesse grupo de pacientes.

Considerando todos os resultados encontrados no presente estudo, o sialotropismo do HCV levando à alterações de glândulas salivares, amplamente difundido na literatura, ainda deixa questões a serem resolvidas, e novas hipóteses sobre as frequentes alterações de glândulas salivares em pacientes com hepatite C devem ser testadas. Dessa forma, a determinação quantitativa e qualitativa do infiltrado inflamatório presente nas glândulas salivares menores desses pacientes, bem como a detecção do HCV por técnica de imunistoquímica ou hibridização *in situ* nos tecidos bucais poderiam ser importantes aliadas no esclarecimento biológico do possível mecanismo patogênico induzido pelo HCV nas alterações de glândulas salivares, em pacientes com hepatite C crônica.

8. Conclusões

1. O HCV RNA foi detectado mais frequentemente na saliva (39,0%) que em amostras de glândulas salivares (18,5%), sendo que em 6 (9,2%) pacientes o HCV RNA foi detectado concomitantemente nas amostras de saliva e de glândula salivar, sem significância estatística.
2. A xerostomia e a hipossalivação foram frequentes no grupo estudado. No entanto, nossos achados não sugerem relação entre a presença do HCV RNA na saliva e em glândulas salivares e estas alterações.
3. Embora nenhum paciente tenha mostrado evidências clínicas de sialoadenite ou Síndrome de Sjögren, histologicamente, a presença do infiltrado inflamatório foi observada em 31/65 (47,7%) das amostras, sem correlação com a presença do vírus na glândula salivar. Esses achados sugerem a falta de associação entre a sialoadenite em pacientes com hepatite C crônica e presença do vírus na glândula.
4. As alterações de mucosa bucal observadas nos pacientes com hepatite C crônica (55,9%) não puderam ser associadas às desordens de glândulas salivares. Entretanto, o líquen plano bucal esteve associado à infecção pelo HCV.
5. O HCV RNA foi mais prevalente na saliva de pacientes com doença hepática avançada, embora essa relação não tenha sido estatisticamente significativa, assim como em relação aos dados demográficos ou relativos à história médica dos pacientes. Se essa associação realmente existe, ela deve ser melhor investigada.

Anexos

ANEXO 1**PRONTUÁRIO Nº**

DATA: ___/___/___

FICHA Nº

NOME:

NATURALIDADE:

DATA DE NASCIMENTO: ___/___/___

IDADE:

PROCEDÊNCIA:

SEXO:

ENDEREÇO:

COR:

TEL.:

DADOS RELEVANTES DA HISTÓRIA MÉDICA:

DATA DE DIAGNÓSTICO DE HCV: ___/___/___

FATOR DE RISCO:

HEPATITE CRÔNICA PELO VÍRUS C: () SINTOMÁTICA () ASSINTOMÁTICA

USO DE ÁLCOOL: () SIM () NÃO USO DE TABACO: () SIM () NÃO

NÃO

CIRROSE: () SIM () NÃO

FIBROSE HEPÁTICA: () SIM () NÃO

USO DE PRÓTESE: () SIM () NÃO Qual tipo?

Quanto tempo?

MEDICAMENTOS EM USO:

- -

EXAME CLÍNICO INTRABUCAL

- | | | |
|--|------------|--------------------------|
| 1-) Lábio Superior | () Normal | () Alterado |
| 2-) Lábio Inferior | () Normal | () Alterado |
| 3-) Comissura Labial | () Normal | () Alterado Lado: _____ |
| 4-) Mucosa Jugal | () Normal | () Alterado Lado: _____ |
| 5-) Rebordo Alveolar/ Gengiva Superior | () Normal | () Alterado |
| 6-) Rebordo Alveolar/ Gengiva Inferior | () Normal | () Alterado |
| 7-) Língua | () Normal | () Alterado |
| 8-) Assoalho Bucal | () Normal | () Alterado |
| 9-) Palato Duro | () Normal | () Alterado |
| 10-) Palato Mole | () Normal | () Alterado |
| 11-) Orofaringe | () Normal | () Alterado |
| 12-) Mucosa alveolar | () Normal | () Alterado |

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA LESÃO:

TEMPO DA DOENÇA: _____ () INDETERMINADO LOCALIZAÇÃO:

TIPO DE LESÃO: () Úlcera () Mácula () Nódulo () Erosão
 () Vésico-Bolhosa () Placa () Vegetante () Tumoral

COLORAÇÃO: () Eritematosa () Acastanhada () Enegrecida () Branca
 () Arroxeadada () Amarela () Semelhante à mucosa bucal

SINTOMATOLOGIA: () Sintomático () Assintomático

TAMANHO DA LESÃO: _____ mm

MANIFESTAÇÃO: () Primitiva () Recorrente

DIAGNÓSTICO CLÍNICO:

XEROSTOMIA (Queixa): () SIM () NÃO

OBSERVAÇÕES:

ANEXO 2

Questionário da Escala Visual Analógica (cada reta = 100 mm de comprimento)

1. Marque a dificuldade que você tem para falar devido à secura

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Não é difícil						Muito difícil				

2. Marque a dificuldade que você tem para engolir devido à secura

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Não é difícil						Muito difícil				

3. Marque a quantidade de saliva na sua boca

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Muita saliva						Nenhuma saliva				

4. Marque a secura da sua boca

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Não é seca						Muito seca				

5. Marque a secura da sua garganta

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Não é seca						Muito seca				

6. Marque a secura dos seus lábios

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Não são secos						Muito secos				

7. Marque a secura da sua língua

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Não é seca						Muito seca				

8. Marque o grau da sua sede

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Não sinto sede						Sinto muita sede				

ANEXO 3

Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP


Parecer nº. ETIC 192/06

Interesse: Profa. Maria Auxiliadora Vieira do Carmo
Depto de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológica
Faculdade de Odontologia -UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP, aprovou *ad referendum*, no dia 24 de agosto de 2006, depois de atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado “**Alterações de glândulas salivares em pacientes com hepatite C crônica**” bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Profa. Dra. Maria Eléna de Lima Perez Garcia
Presidente do COEP/UFMG

ANEXO 4



Universidade Federal de Minas Gerais
Hospital das Clínicas
Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão - DEPE

UFMG

Belo Horizonte, 27 de setembro de 2006.

PROCESSO Nº 080/06

TÍTULO: "Alterações de glândulas salivares em pacientes com Hepatite C Crônica."

Sr(a) Pesquisador(a):

Reportando-nos ao projeto de pesquisa acima referenciado, considerando sua concordância com o parecer da Comissão de Avaliação 24/08/2006, esta Diretoria aprova seu desenvolvimento no âmbito institucional.

Solicitamos enviar à DEPE relatório parcial ou final, após um ano.

Atenciosamente,

PROF. HENRIQUE VITOR LEITE
Diretor da DEPE/HC-UFMG

À
Soraya de Mattos C. Grossmann Almeida
Depto. Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológica
Faculdade de Odontologia/UFMG

ANEXO 5

Data ___/___/___

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Prezados senhores(as),

Meu nome é Soraya de Mattos Camargo Grossmann e, junto com meus orientadores, Prof. Dra. MARIA AUXILIADORA VIEIRA DO CARMO da Faculdade de Odontologia da UFMG, da Prof. Dra. ROSÂNGELA TEIXEIRA da Faculdade de Medicina da UFMG, e do pesquisador Dr. GUILHERME CORRÊA DE OLIVEIRA da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) estamos realizando uma pesquisa com os pacientes portadores de Hepatite C crônica. O estudo se chama “ALTERAÇÕES DE GLÂNDULAS SALIVARES EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA”. Vamos esclarecer todas as etapas a serem realizadas:

1. O estudo se destina a procurar alterações de glândulas salivares em pacientes com hepatite C crônica.
2. A importância deste estudo é a de investigar se o vírus da hepatite C causa alterações nas glândulas salivares.
3. A pesquisa vai verificar se os pacientes com hepatite C crônica têm o vírus na saliva e nas glândulas salivares, através da medição de saliva em pacientes com e sem queixa de boca seca, e retirada de um pequeno fragmento de glândula salivar do seu lábio inferior para saber se o vírus da hepatite C está presente neste local.
4. O estudo será feito da seguinte maneira: primeiramente, você responderá a um questionário simples sobre sensação de boca seca; em seguida será coletada uma pequena quantidade de saliva e, em um dia agendado, será realizada a retirada de um pequeno fragmento de glândula salivar, no seu lábio inferior; sendo muito importante sua participação em todas as etapas.
5. Os procedimentos são simples e realizados com pessoas preparadas, sendo a retirada do pequeno fragmento de glândula salivar um procedimento simples, rápido, feito sob anestesia local com um mínimo de desconforto, que é passageiro.
6. Todas as etapas do trabalho serão realizadas com material individual e estéril sem riscos à sua saúde física e mental.
7. Caso precise poderá contar com a assistência de todos os responsáveis pela pesquisa.
8. Com a sua participação esperamos ter maiores conhecimentos sobre a associação entre as alterações de glândulas salivares e a infecção pelo vírus da hepatite C.
9. A sua participação será acompanhada no Ambulatório de Hepatites Virais do IAG-HC-UFMG e Clínica de Semiologia e Patologia II da Faculdade de Odontologia da UFMG.

10. Sempre que desejar, serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo.
11. A qualquer momento, você poderá desistir de participar do estudo sem que isso lhe traga qualquer penalidade ou prejuízo.
12. As informações conseguidas através da sua participação são sigilosas e não permitirão sua identificação, exceto aos responsáveis pelo estudo. A divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto.
13. No caso de ser verificada a presença de alguma alteração na glândula salivar ou de lesões de mucosa bucal você será encaminhado para exames complementares nos departamentos responsáveis.

Os telefones das pesquisadoras para quaisquer esclarecimentos são:

Soraya (Cirurgiã-dentista) 8729-6685

Maria Auxiliadora (Orientadora) 3499-2476

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP): 32489364

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, documento nº _____, tendo compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no estudo e estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implicam, concordo em dele participar e para isso eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

(Assinatura)