



MURILO DE FREITAS PEIGO

**INFECÇÃO ATIVA POR HERPESVÍRUS EM PACIENTES COM
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO (LES)**

CAMPINAS

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

MURILO DE FREITAS PEIGO

**INFECÇÃO ATIVA POR HERPESVÍRUS EM PACIENTES COM LÚPUS
ERITEMATOSO SISTÊMICO (LES)**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas – UNICAMP para obtenção do Título de Mestre em
Clínica Médica na área de concentração Clínica Médica.*

ORIENTAÇÃO: Prof^ª .Dra. SANDRA CECILIA BOTELHO COSTA
CO-ORIENTAÇÃO: Prof^ª .Dra. SANDRA HELENA ALVES BONON

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA POR MURILO DE FREITAS
PEIGO E ORIENTADO PELA PROF^ª DRA.
SANDRA CECILIA BOTELHO COSTA**

Assinatura da Orientadora

CAMPINAS

2012

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

P351i Peigo, Murilo de Freitas, 1987-
Infecção ativa por herpesvírus em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) / Murilo de Freitas Peigo. – Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador: Sandra Cecília Botelho Costa.
Coorientador: Sandra Helena Alves Bonon.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Herpesviridae. 2. Lúpus eritematoso sistêmico. 3. Citomegalovírus. 4. Herpesvírus humano. 5. Infecções por vírus Epstein-Barr. I. Costa, Sandra Cecília Botelho, 1951-. II. Bonon, Sandra Helena Alves. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Herpesvirus active infection in patients with systemic lupus erythematosus (SLE)

Palavras-chave em inglês:

Herpesviridae

Lupus erythematosus, Systemic

Cytomegalovirus

Herpesvirus 6, Human

Epstein-Barr virus infections

Área de concentração: Clínica Médica

Título: Mestre em Clínica Médica

Banca examinadora:

Sandra Cecília Botelho Costa [Orientador]

Maurício Lacerda Nogueira

André Fattori

Data de defesa: 27-08-2012

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

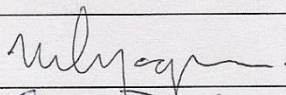
Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Murilo de Freitas Peigo

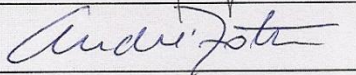
Orientador: Profa. Dra. Sandra Cecilia Botelho Costa

Membros:

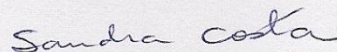
1. Prof. Dr. Mauricio Lacerda Nogueira



2. Prof. Dr. André Fattori



3. Profa. Dra. Sandra Cecilia Botelho Costa



Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 27/08/2012

DEDICATÓRIA

A todos que desde o começo compartilharam comigo desta única e valiosa experiência.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Dra. Sandra Cecília Botelho Costa por ter aceitado me acompanhar nesta valiosa jornada.

Agradeço também a Dra. Sandra Helena Alves Bonon pelo intenso acompanhamento, conselhos e empenho durante minha formação.

Agradeço a Dra. Lilian Tereza Lavras Costallat por ter me recebido de braços abertos na Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Ciências Médicas sempre muito solícita as minhas questões.

Agradeço a todos os alunos que passaram pelo laboratório e me ajudaram direta ou indiretamente neste trabalho.

Agradeço a minha família por toda a compreensão, paciência e carinho durante este período de crescimento pessoal e profissional.

Por fim agradeço aos pacientes por acreditarem no projeto e aceitarem participar deste estudo.

RESUMO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma patologia sistêmica do tecido conjuntivo, que se apresenta de maneira variada na dependência do órgão afetado, da gravidade de seu acometimento e da idade do paciente, tendo influência de fatores raciais, de padrões imunológicos e ambientais. Pacientes lúpicos têm grande predisposição para desenvolver infecções graças à imunossupressão induzida pela própria doença como pelo uso de vários medicamentos em seu tratamento. Infecções causadas por herpesvírus, principalmente o Citomegalovírus Humano (CMV) e o Epstein-Barr (EBV), têm sido implicadas em várias doenças autoimunes graves, incluindo o LES. A reativação dos herpesvírus 6 e 7 (HHV-6 e HHV-7) geralmente ocorre em pacientes imunodeprimidos, mas seus papéis ainda são pouco estudados. As infecções por herpesvírus têm influência tanto no início do processo autoimune quanto na exacerbação da progressão da doença. A identificação de pacientes com alto risco de desenvolver doença pelos herpesvírus pode ser realizada utilizando técnicas de detecção de infecção ativa, como a Reação em Cadeia da Polimerase (Nested-PCR) e a detecção do antígeno *pp65* do CMV (Antigenemia). Dependendo do caso, estes pacientes podem receber tratamento com antivirais. Diante do exposto, os objetivos deste estudo foram: monitorizar os pacientes com LES em relação à infecção ativa por CMV, EBV, HHV-6 e HHV-7, utilizando as técnicas de Nested-PCR e de antigenemia, bem como avaliar o impacto clínico dessas infecções. Foram incluídos neste trabalho, amostras de sangue de 71 pacientes em seguimento no Departamento de Reumatologia da Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP, com diagnóstico de LES confirmado, sendo que 20/71 (28%) estavam com o lúpus ativo (SLEDAI $\geq$ 8) e 51/71 (72%) dos pacientes não tinham atividade lúpica (SLEDAI $<$ 8).

Das amostras de sangue pesquisadas, 10/71 (14%) foram positivas para os herpesvírus estudados, sendo que 90% destes pacientes com infecção ativa apresentavam o lúpus em atividade ($p \leq 0,006$). Infecção ativa pelo CMV ocorreu em 4 pacientes (5,6%). HHV-7 foi detectado em 4 amostras (5,6%). Dois outros pacientes apresentaram dupla infecção por CMV e HHV-7 (2,8%). Infecção ativa pelo EBV e HHV-6 não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas. Dois pacientes foram a

óbito, sendo que um deles evoluiu com sepse de foco pulmonar (provável doença por CMV) e o outro com sepse por *Pseudomonas aeruginosa*. Diante dos resultados obtidos, podemos observar que a infecção ativa pode ocorrer nos pacientes com LES, principalmente naqueles com a doença em atividade. Poucos estudos têm avaliado o impacto destas infecções no cuidado diário dos pacientes com LES. Acreditamos que este trabalho seja pioneiro e será de fundamental importância, contribuindo com este grupo de pacientes. Entretanto, futuros estudos deverão ser implementados com um número maior de pacientes e de coletas/paciente, principalmente naqueles com LES em atividade, que foram demonstrados com aqueles com fator de risco aumentado.

ABSTRACT

Systemic lupus *erythematosus* (SLE) is a connective tissue systemic pathology that presents itself in several ways, depending on the organ affected, the seriousness of the disease and patient's age, being influenced by racial factors, immunologic and environmental patterns. SLE patients have great predisposition to develop infections due to the immunosuppression induced by the disease itself and by the use of medicine in the treatment. Infections caused by herpesvirus, especially Human Cytomegalovirus (CMV) and Epstein-Barr (EBV), have been developed into several serious autoimmune diseases, including SLE. Herpesvirus 6 and 7 (HHV-6 and HHV-7) reactivation generally occurs in immunodepressed patients, but their roles are unclear. Herpesvirus infections have influence both on the beginning of the autoimmune process and on the aggravation of the disease progression. The patients that present high risks of developing herpesvirus related diseases can be identified using active infection detection techniques, such as the Nested polymerase chain reaction (Nested-PCR) and the CMV pp65 antigen detection (antigenemia). Depending on the case, the patients can receive treatment with antivirals. Face to the exposed, the objectives of this study were: to monitor the patients with SLE with regard to active infection by CMV using Nested-PCR and antigenemia techniques, and EBV, HHV-6, HHV-7 in serum, as well as to evaluate the clinic impact to these infections. There were included in this work blood samples of 71 patients that are being treated at the Department of Rheumatology, Faculty of Medical Sciences – University of Campinas - UNICAMP, with a confirmed SLE diagnosis, given that 20/71 (28%) had active lupus (SLEDAI ≥ 8) and 51/71 (72%) of the patients didn't present lupic activity (SLEDAI < 8). Considering the blood samples researched, 10/71 (14%) were positive for the studied herpesvirus, and 90% of the patients with active infection presented lupus in activity ($p \leq 0,006$). Active infection by CMV was observed in 4 patients (5,6%). HHV-7 was detected in 4 samples (5,6%). Two other patients presented double infection by CMV and HHV-7 (2,8%). Active infection by EBV and HHV-6 was not detected in any of the analyzed samples. Two patients have deceased, whose conditions developed into pulmonary sepsis (probable disease by CMV) and into *Pseudomonas aeruginosa* sepsis, respectively. After analyzing the

achieved results, we observe that active infection can appear in patients with SLE, especially in those with the disease in activity. Few studies have evaluated the impact of these infections on the daily care of patients with SLE. In this sense, we believe that this work is pioneer and that it will be of fundamental importance, contributing to this group of patients. However, future studies should be implemented, with a larger number of patients and samples, especially those with SLE in activity, which are the ones with increased risk factor as shown.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR – American College of Rheumatology

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

AINE- Anti-inflamatórios não Esteroidais

ANA – Anticorpo Antinuclear

Anti-Sm – Anti-Smith

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BILAG - British Isles Lupus Assessment Group

CFO - Ciclofosfamida

CMV/HHV-5 – Herpesvírus humano 5 / Citomegalovírus

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EBV – Herpesvírus humano 4 / Epstein-Barr

EDTA – Anticoagulante Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

EPI – Equipamento de proteção individual

FAN- Fator Antinúcleo

FCM – Faculdade de Ciências Médicas

HC – Hospital das Clínicas

HHV-6 – Herpesvírus humano 6

HHV-7 – Herpesvírus humano 7

HLA – Antígeno Leucocitário Humano

HSV-1/HHV-1 – Herpesvírus humano 1

HSV-2/HHV-2 – Herpesvírus humano 2

IL – Interleucina

INF- α – Intérferon α

KSHV/HHV-8 – Herpesvírus humano 8

LAI - University of California, San Francisco/Johns Hopkins University Lupus Activity Index

LES - Lúpus Eritematoso Sistêmico

LMP – Proteínas de Membrana

MHC - Complexo Maior de Histocompatibilidade

N-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase tipo Nested

PBMC – Células Mononucleares de Sangue Periférico

PBS – Solução Tampão Fosfato

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

RPM – Rotações por Minuto

SLAM - Systemic Lupus Activity Measures

SLEDAI - Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index

SNC – Sistema Nervoso Central

TGO – Transaminase Glutâmico Oxalacética

TGP – Transaminase Glucâmico Pirúvica

TNF- α – Fator de necrose tumoral α

UV – Ultravioleta

VHS – Velocidade de Hemossedimentação

VZV/HHV-3 – Herpesvírus humano 3

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Critérios para classificação e diagnóstico do Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES)	21
TABELA 2 – Classificação dos herpesvírus	25
TABELA 3 – Tipos de amostras e técnicas utilizadas para detecção de infecção ativa pelos herpesvírus em estudo	45
TABELA 4 – Sequência dos primers utilizados na Nested-PCR para a EBV	45
TABELA 5 – Concentrações de reagentes e ciclos utilizados durante a Reação em Cadeia da Polimerase tipo Nested(N-PCR) – 35ciclos.	45
TABELA 6 – Sequência dos primers externos e internos que flanqueiam uma região conservada do genoma do CMV, utilizados na PCR e na Nested-PCR.....	49
TABELA 7 – Concentrações de reagentes e ciclos utilizados durante a Reação em Cadeia da Polimerase tipo Nested (N-PCR) – 30 ciclos	50
TABELA 8 – Sequência dos primers utilizados na Nested-PCR para HHV-6	50
TABELA 9 – Concentração de Reagentes e Ciclos utilizados durante a Reação em Cadeia da Polimerase tipo Nested (N-PCR) – 30 ciclos	51
TABELA 10 – Sequência de primers utilizados na Nested-PCR para HHV-7	51
TABELA 11 – Concentrações de reagentes e ciclos utilizados durante a Reação em Cadeia da Polimerase tipo Nested (N-PCR) – 30 ciclos	52
TABELA 12 – Sequência de primers que flanqueiam uma região conservada do gene da β - Globina utilizados na PCR	52
TABELA 13 – Concentrações de reagentes e ciclos utilizados durante a Reação em Cadeia da Polimerase – 40 ciclos	53
TABELA 14 – Características dos 71 pacientes incluídos no estudo.	58
TABELA 15 – Total de exames realizados durante o estudo	59

TABELA 16 – Pacientes com Infecção Ativa causada pelos Herpesvírus estudados, grau de imunossupressão e fármaco utilizado	60
--	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura do Epstein-Barr vírus, EBV.....	27
FIGURA 2 – Estrutura do Citomegalovírus Humano, CMV	30
FIGURA 3 – Estrutura do Herpesvírus Humano 6, HHV-6.....	34
FIGURA 4 – Fotomicrografia eletrônica do HHV-7 exibindo sua ultraestrutura ¹²²	37
FIGURA 5 – Leituras das lâminas em microscópio óptico (marca NIKON - Eclipse E200)	48
FIGURA 6 – Eletroforese em gel de agarose de produtos da Nested-PCR para EBV	53
FIGURA 7 – Eletroforese em gel de agarose de produtos da Nested-PCR para CMV reveladas com brometo de etídio e fotografadas sob luz UV	54
FIGURA 8 – Eletroforese em gel de agarose de produtos da Nested-PCR para HHV-6 de 1 amostra positiva, reveladas com brometo de etídio e fotografadas sob luz UV ..	55
FIGURA 9 – Eletroforese em gel de agarose de produtos da nested-PCR para HHV-7 de 4 amostras positivas, reveladas com brometo de etídio e fotografadas sob luz UV	55
FIGURA 10 – Eletroforese em gel de agarose de produtos da PCR para β -Globina de 8 amostras positivas, reveladas com brometo de etídio e fotografadas sob luz UV....	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Lúpus Eritematoso Sistêmico	19
1.1.1	História	19
1.1.2	Definição.....	19
1.1.3	Etiologia.....	19
1.1.4	Diagnóstico e Classificação.....	21
1.1.5	Epidemiologia	23
1.1.6	Índice de Atividade Lúpica	23
1.1.7	Tratamento do Lúpus Eritematoso Sistêmico	23
1.1.8	Lúpus Eritematoso Sistêmico e Infecções	24
1.2	Herpesvírus	24
1.2.1	Epstein-Barr (HHV-4 ou EBV).....	26
1.2.2	Citomegalovírus Humano (CMV)	29
1.2.3	Herpesvírus Humano 6 (HHV-6).....	33
1.2.4	Herpesvírus Humano (HHV-7).....	36
2	RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	41
3	OBJETIVOS.....	42
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS	43
4.1	Casuística	43
4.1.1	Critérios para inclusão dos pacientes no estudo	43
4.1.2	Critérios de suspensão ou encerramento	43
4.1.3	Critérios para Caracterização de Atividade Lúpica	43
4.1.4	Critérios para Caracterização de Infecção Ativa pelos herpesvírus.....	44
4.1.5	Graus de Imunossupressão.....	44
4.1.6	Sigilo dos Dados Obtidos	44
4.2	Métodos Laboratoriais e Tipos de Amostras Utilizadas no Diagnóstico de Infecção Ativa	44

4.2.1	Detecção de Infecção Ativa Pelo Epstein-Barr	45
4.2.2	Detecção de Infecção Ativa Pelo Citomegalovírus	46
4.2.3	Detecção de Infecção Ativa Pelo Herpesvírus Humano 6	50
4.2.4	Detecção de Infecção Ativa Pelo Herpesvírus Humano 7	51
4.2.5	Detecção do Gene da β -Globina Humana	52
4.2.6	Visualização dos Fragmentos Amplificados Pela Nested-PCR	53
4.3	Biossegurança	56
4.4	Análise Estatística	57
5	RESULTADOS	58
5.1	Característica dos Pacientes Incluídos no Estudo	58
5.2	Total De Exames Realizados Durante A Monitorização	58
5.3	Ocorrência de Infecção Ativa causada pelos Herpesvírus nos pacientes estudados e atividade lúpica.....	59
5.4	Relato dos casos dos 10 pacientes que apresentaram infecção ativa causada pelos herpesvírus estudados	60
6	DISCUSSÃO	63
7	CONCLUSÃO	66
8	APOIO.....	67
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
10	ANEXO 1	83
11	ANEXO 2	85

1 INTRODUÇÃO

1.1 Lúpus Eritematoso Sistêmico

1.1.1 História

O Lúpus foi primeiramente descrito pelo dermatologista francês Biett em 1828¹. Foram relatados nos primeiros estudos apenas descrições da doença, com ênfase nos problemas de pele. Quarenta e cinco (45) anos mais tarde, um dermatologista chamado Kaposi observou que alguns pacientes com lesões cutâneas típicas de Lúpus também apresentavam órgãos internos afetados ². Nos anos 1890, o americano Willian Osler observou que o Lúpus podia afetar órgãos internos sem lesões na pele². Em 1948, foi descrita por Malcon Hargraves a célula LE como uma célula em partículas encontrada no sangue de pacientes com LES (Lúpus Eritematoso Sistêmico)³. Possibilitou-se então, através desta descoberta, que médicos identificassem mais casos de LES usando simplesmente um exame sanguíneo. Desde então, vários anticorpos, que agem contra os tecidos, vêm sendo associados ao LES. A detecção destes tem sido usada para desenvolver testes mais sensíveis ao diagnóstico do LES⁴.

1.1.2 Definição

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica do tecido conjuntivo caracterizada por alterações autoimunes e grandes variedades de manifestações clínicas. Diversos órgãos e/ou sistemas podem ser acometidos de forma concomitante ou consecutiva, com prognóstico e evolução muitas vezes imprevisíveis⁵.

1.1.3 Etiologia

O LES é uma doença multissistêmica, extremamente complexa, caracterizada pela produção de diversos autoanticorpos e inflamação que envolve quase todos os órgãos do corpo⁶.

A doença apresenta-se de maneira variada na dependência do órgão afetado, da gravidade de seu acometimento e da idade do paciente, sob influência de predisposição racial e de padrões imunológicos. Evolui com manifestações clínicas polimórficas, com períodos de exacerbações e remissões. De etiologia não esclarecida, o desenvolvimento

da doença está ligado à predisposição genética e fatores ambientais como: luz ultravioleta, medicamentos e vírus⁷. Pacientes lúpicos têm grande propensão para desenvolver infecções⁸, devido não só à imunossupressão induzida pela própria doença⁹, mas também pelo uso de vários medicamentos para seu tratamento⁵.

Apesar dos avanços ocorridos na ciência, alguns aspectos permanecem desconhecidos quanto à etiologia e fisiopatologia do LES. Desta maneira, a interação de fatores genéticos, virais, hormonais e ambientais são admitidos de forma que participem do desencadeamento e desenvolvimento da doença¹⁰.

Fatores que estão possivelmente envolvidos na etiologia da doença:

Fatores Genéticos: O risco relativo de desenvolvimento do LES entre familiares é cerca de 6,8 vezes maior quando comparados a uma população controle¹¹. Quanto aos antígenos leucocitários humanos, uma maior frequência de HLA-DR2 e DR3 têm sido demonstradas em pacientes com lúpus¹².

Fatores Hormonais: Com relação a estes fatores, observa-se um predomínio da doença em adultas, durante gestação, no pós-parto e com o uso de anticoncepcionais orais, em particular aqueles que contêm estrógenos, uma vez que elevam a produção de autoanticorpos e são capazes de ocasionar depressão da imunidade celular¹³.

Fatores Ambientais: Quanto aos fatores ambientais, o antecedente de exposição solar aparece em cerca de 38% dos pacientes com lúpus em atividade e o número de novos casos ou de exacerbação da doença em países de clima frio é mais elevado no verão e nos últimos meses da primavera¹⁴. Outro exemplo sugerido é que a influência da luz ultravioleta poderia ser explicada pela indução de células T supressoras ou pelo aumento da apoptose dos queratinócitos¹³. Dentro dos fatores ambientais, alguns autores inserem também o estresse psicológico. Este fator vem sendo considerado com particular importância no desencadeamento e no agravamento da doença¹⁵.

Fatores Infeciosos: Embora nenhum estudo tenha comprovado uma etiologia viral para o LES, alguns agentes virais também participam no desencadeamento da doença¹⁶.

Com relação aos efeitos das infecções nas doenças autoimunes, três são os mecanismos propostos:

- Imunogenicidade aumentada por antígenos de órgãos secundários à inflamação mediada pelas infecções;
- Ativação policlonal dos linfócitos;
- Mimetismo molecular: quando anticorpos produzidos contra um antígeno específico reconhecem também células do próprio organismo, que, por sua vez, é parecido com o antígeno já reconhecido anteriormente. A doença autoimune é uma resposta imunológica contra um antígeno próprio. São possíveis mecanismos da autoimunidade: reação cruzada entre Ag de microrganismos estruturalmente similares aos antígenos próprios e quando um peptídeo próprio deixa de ser tolerado, o que provoca a aparição de mais autoantígenos (dispersão de antígenos)¹⁷.

1.1.4 Diagnóstico e Classificação

Para o diagnóstico do LES, costuma-se utilizar os critérios de classificação propostos, em 1982, pelo American College of Rheumatology e revisados em 1997. O diagnóstico baseia-se na presença de quatro ou mais dos onze critérios estabelecidos: eritema malar; lesão discóide, fotossensibilidade; úlceras orais-nasais; artrite; serosite; comprometimento renal; alterações neurológicas; hematológicas; imunológicas; e presença de anticorpos antinucleares⁵.

TABELA 1 – Critérios para classificação e diagnóstico do Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES)

CRITÉRIOS	DEFINIÇÕES
Eritema Malar	Eritema fixo, plano ou elevado sobre as eminências malares com tendência a poupar as pregas nasolabiais.
Erupção Discóide	Manchas eritematosas elevadas com escamas ceratóticas aderentes e entupimento folicular; pode ocorrer fibrose atrófica nas lesões mais antigas.

TABELA 1 – Critérios para classificação e diagnóstico do Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES)

(conclusão)

CRITÉRIOS	DEFINIÇÕES
Fotossensibilidade	Erupção cutânea com resultado de reação incomum à luz solar, pela história do paciente ou pela observação do médico.
Úlceras Orais	Ulceração oral ou nasofaríngea, habitualmente indolor, observada por um médico.
Artrite	Artrite não erosiva com acometimento de duas ou mais articulações periféricas caracterizada por hipersensibilidade, tumefação ou derrame.
Serosite	Pleurite – relato convincente de dor pleurítica ou atrito ouvido por um médico ou evidências de derrame pleural; Pericardite – documentada por ECG ou atrito ou evidências de derrame pericárdico.
Distúrbio Renal	Proteinúria persistente superior a 0,5g/dia ou superior a 3+ quando não se realiza quantificação; cilindros celulares – podem ser hemáticos, de Hb, granulares, tubulares ou mistos.
Distúrbios Neurológicos	Convulsões na ausência de medicamentos responsáveis ou de distúrbios metabólicos conhecidos; psicose na ausência de medicamentos responsáveis ou de distúrbios metabólicos conhecidos.
Distúrbios Hematológicos	Anemia hemolítica com reticulocitose ou Leucopenia inferior a 4.000mm ³ em duas ou mais ocasiões; Linfopenia inferior a 1.500 mm ³ em duas ou mais ocasiões ou Trombocitopenia menos de 100.000mm ³ na ausência de medicamentos responsáveis.
Anticorpo Antinuclear	Um título anormal de anticorpo antinuclear por imunofluorescência ou por ensaio equivalente em qualquer momento no tempo e na ausência de medicamentos sabidamente associados com a “síndrome lúpica induzida por medicamentos”.
Alterações Imunológicas	Anticorpos anti-DNA dupla cadeia; anti-Sm ou anticorpos Sm nucleares; falso-positivo para sífilis por pelo menos seis meses; anticorpos antifosfolípideo.

Fonte: SATO; CONSTALLAT, 2004⁵.

1.1.5 Epidemiologia

O LES acomete preferencialmente mulheres em uma faixa de idade entre 18 e 40 anos, atingindo predominantemente o sexo feminino^{18; 19}, numa proporção de nove a dez mulheres para um homem, e com prevalência variando de 20 a 70/100.000 habitantes²⁰. Com relação à apresentação da doença entre as raças, observa-se a frequência de 1/250 em mulheres negras nos Estados Unidos da América; 10,3/100.000 caucasianos e 22,4/100.000 asiáticos^{20; 21; 22; 23; 24}. Já no Brasil, principalmente na região sudeste, observa-se uma frequência maior entre caucasoides²⁵.

1.1.6 Índice de Atividade Lúpica

O grau da atividade da doença em um paciente com LES é de grande importância, visto que muitas decisões terapêuticas baseiam-se nesta avaliação²⁶.

Dentre os sistemas de critérios de atividade já publicados, os mais amplamente testados têm sido: SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*), SLAM (*Systemic Lupus Activity Measures*), BILAG (*British Isles Lupus Assessment Group*) e LAI (*University of California, San Francisco/Johns Hopkins University Lupus Activity Index*).

Neste trabalho, utilizamos o SLEDAI (ANEXO 1), que se apresenta como um formulário com 24 itens, cujas definições encontram-se ao lado dos itens: aqueles que estão presentes são anotados na coluna dos pontos e o total é calculado pela soma desses pontos, que varia de 0 a 105. Itens que se relacionam a risco de vida têm pesos maiores. Dependendo do índice do SLEDAI, o paciente será considerado como ativo ou não ativo²⁷.

1.1.7 Tratamento do Lúpus Eritematoso Sistêmico

Uma vez que a grande maioria dos sintomas decorrentes do LES decorre da inflamação, os tratamentos comumente destinam-se ao controle do processo inflamatório. São principalmente utilizados os grupos de medicamentos:

Anti-inflamatórios não Esteroidais (AINE's): são utilizados para controlar a dor provocada pela artrite. Geralmente prescritos apenas em pequenos períodos de tempo, com instrução de diminuição da dosagem conforme ocorram melhoras na artrite.

Glicocorticóides: são os principais utilizados nas terapias para o LES. A prednisona ou a prednisolona são utilizadas para reduzir a inflamação e para imunossuprimir a atividade alterada no sistema imunitário. De maneira geral, o controle inicial da doença somente é alcançado com a administração diária de glicocorticosteróides por um período de várias semanas ou meses, requerendo a manutenção destes medicamentos durante vários anos.

Imunossupressores: a azatiopina e a ciclofosfamida agem de modo diferente dos glicocorticoides. Suprimem a inflamação e tendem ainda a diminuir a resposta do sistema imunitário. Estes medicamentos podem ser utilizados quando os glicocorticoides, por si só, não conseguem controlar o LES⁵.

1.1.8 Lúpus Eritematoso Sistêmico e Infecções

O reconhecimento de uma infecção associada ao lúpus é de fundamental importância, visto que ela é uma das principais causas de morte nesses pacientes, superando até mesmo a mortalidade causada pela atividade da própria doença²⁸.

As infecções virais são causas importantes de morbidade e mortalidade em pacientes imunodeprimidos e as viroses do grupo herpes continuam sendo uma das mais importantes^{8; 29; 30; 31; 32; 33}. Embora a possibilidade de uma infecção viral seja sempre lembrada frente a um paciente lúpico febril, as infecções oportunistas nem sempre são devidamente consideradas²⁹ e poucos trabalhos na literatura têm avaliado o impacto das infecções herpéticas em pacientes com LES³⁴.

1.2 Herpesvírus

Os herpesvírus humanos pertencem à família *Herpesviridae*, são vírus ubíquo e uma vez ocorrida a primo-infecção, permanecem no organismo do indivíduo afetado (latência) durante toda a vida. Estes vírus provocam uma grande variedade de doenças,

sendo que as infecções são frequentemente benignas, podendo, contudo, em indivíduos imunodeprimidos, causar manifestações clínicas de gravidade variada^{35; 36}.

A família *Herpesviridae* está dividida em 3 subfamílias. Estas se distinguem pelas suas características virais e estruturais, bem como pelo seu poder patogênico. Todos os tipos de vírus inseridos nesta família são vírus de DNA com cadeia dupla e os diferentes tipos de herpesvírus partilham características estruturais semelhantes.

TABELA 2 – Classificação dos herpesvírus

Vírus	Sinônimo	Subfamília	Abreviação
Herpesvírus Humano - 1	Herpes simplex - 1	α	HSV-1/HHV-1
Herpesvírus Humano - 2	Herpes simplex - 2	α	HSV-2/HHV-2
Herpesvírus Humano - 3	Varicella-zoster	α	VZV/HHV-3
Herpesvírus Humano - 4	Epstein-Barr	γ	EBV/HHV-4
Herpesvírus Humano - 5	Citomegalovírus	β	CMV/HHV-5
Herpesvírus Humano - 6	Não há	β	HHV-6
Herpesvírus Humano - 7	Não há	β	HHV-7
Herpesvírus Humano - 8	Associado ao Sarcoma de Kaposi	γ	KSHV/HHV-8

Fonte: elaboração própria.

Os vírus do grupo herpes estabelecem infecções primárias com sintomas, que podem resultar em resposta imunitária eficiente, impedindo uma nova infecção. Contudo, o vírus não é totalmente eliminado, sendo o seu genoma mantido em determinadas células. As infecções latentes podem tornar-se ativas (reativação) devido a fatores internos ao hospedeiro. Estas manifestações permitem a disseminação dos herpesvírus, uma vez que se verifica libertação de vírions extracelulares^{35; 37}.

1.2.1 Epstein-Barr (HHV-4 ou EBV)

Durante um estudo de microscopia eletrônica com células de linfoma de Burkitt, em 1964, o Epstein-Barr (EBV) foi descoberto. Após quatro anos, no ano de 1968, o EBV foi nomeado como o Agente Etiológico da Mononucleose Infecciosa^{38; 39}.

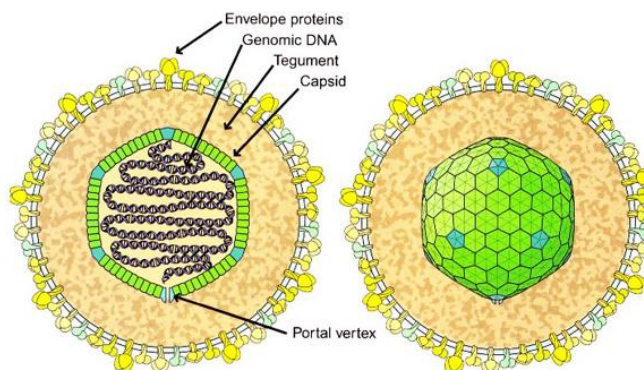
Dois anos após tal descoberta, o DNA do EBV foi encontrado em tecidos de pacientes com carcinoma de nasofaringe e, após uma década, verificou-se a possibilidade desse vírus estar relacionado à doença linfoproliferativa e leucemia de células pilosas em pacientes com imunodeficiência congênita ou adquirida^{38; 39}.

A partir de tais descobertas, o EBV foi identificado em diversos tumores, incluindo as Síndromes linfoproliferativas de Células B, a Linfoma de Células T e Doença de Hodgkin^{40; 41}. Analisando estes dados, a Agência Internacional de Pesquisa, classificou o EBV como carcinógeno de Grau I, comprovando que sua presença em humanos causa neoplasias⁴².

1.2.1.1 Características Biológicas

O EBV é um dos sete herpesvírus patogênicos para o homem, sendo membro da família *Herpesviridae* (HHV-4). Seu genoma viral encontra-se dentro de um envelope e consiste em uma molécula de DNA linear, com 172 quilobases, codificando aproximadamente 100 proteínas virais, que são importantes na regulação da expressão gênica, replicação de DNA, formação de componentes estruturais do vírus e no controle da resposta imune do hospedeiro.

FIGURA 1 – Estrutura do Epstein-Barr vírus, EBV



Fonte: disponível em <<http://cullenlab.duhs.duke.edu/research/ebv>>. Acesso em 22 jul. 2012.

1.2.1.2 Transmissão

O EBV é um vírus extremamente comum e quase 90% dos indivíduos apresentam, em fase adulta, anticorpos contra ele. Em países desenvolvidos, a infecção primária ocorre, geralmente, na adolescência ou até mesmo na fase adulta, causando uma doença linfoproliferativa denominada Mononucleose Infecciosa⁴³. Já em países em desenvolvimento, o número de casos na infância é maior do que o número de casos na adolescência e na fase adulta, e, principalmente, em regiões onde não há saneamento básico e alta densidade populacional, a infecção primária ocorre nos primeiros anos de vida^{43; 44}. O Brasil é considerado um país de endemicidade intermediária⁴⁵.

A transmissão ocorre principalmente pela saliva, embora hemoderivados e órgãos transplantados também possam ser fontes de infecção^{43; 46}. Para o vírus entrar na célula B, o envelope glicoprotéico gp350 liga-se ao receptor viral (molécula CD21) na superfície da célula B. Além disso, moléculas da classe II do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) servem como cofator para a infecção das células B. Cerca de 100 genes virais são expressos durante a replicação, sendo seis proteínas nucleares (EBNAs), duas proteínas de membrana (LMPs) e dois tipos de RNA não traduzidos (EBERs)⁴⁷.

As EBNAs desempenham um papel central na manutenção da infecção latente pelo EBV, sendo necessárias à replicação do genoma viral e à regulação da transcrição dos genes latentes de infecção⁴⁸. O EBNA-1 inibe a resposta imune do hospedeiro ao EBV e a relação do EBNA-1 com carcinomas prediz um pior prognóstico⁴⁹. O EBNA-2 aumenta a expressão das proteínas de membrana latente 1 e 2 (LMP1 e LMP2), contribuindo para o aumento das células B. O EBNA-3 tem por função regular a expressão de genes celulares, aumentando a habilidade do EBNA-2 em regular o LMP1⁴⁷.

1.2.1.3 Manifestações Clínicas

A manifestação clínica do EBV, quando a infecção ocorre durante a infância, mostra-se bastante assintomática ou com sintomas bastante brandos, como o que ocorre em viroses comuns. No entanto, quando a infecção ocorre na fase adulta, a manifestação clínica ocorre de forma bem mais agressiva, podendo causar calafrios, febre alta, linfonodomegalia, placas acinzentadas em orofaringe e amígdalas, prostração intensa e mialgias⁵⁰.

No caso das crianças, a ingestão oral por contato com objetos contaminados é muito menor do que a infecção em adultos durante um beijo. Além disso, o EBV foi encontrado também em amostras de secreções do trato genital feminino, mostrando que a infecção também pode se dar por relações sexuais⁵¹.

Normalmente a doença é autolimitada e raramente prolonga-se por mais de seis meses, quando então passa a ser denominada infecção crônica, ativa, pelo EBV⁴³.

Nos exames laboratoriais de sangue, é possível encontrar leucocitose com linfocitose acentuada na segunda e terceira semanas de infecção. Durante a segunda e sexta semana, são observados os linfócitos de Downey (linfócito atípico com citoplasma aumentado e núcleo condensado). À metade dos casos de infecção pelo EBV pode aparecer trombocitopenia leve⁴⁷.

O EBV foi primeiramente associado a doenças autoimunes em 1971, quando uma alta prevalência do vírus foi encontrada em soro de pacientes com LES^{17; 52}. Durante

anos, esta relação foi fortemente estabelecida e hoje é conhecido que a infecção por EBV precedente ao desenvolvimento de doenças autoimunes pode contribuir para a patogenia do LES via mecanismo de mimetismo molecular entre o antígeno nuclear 1 (EBNA-1) do EBV e auto anticorpos associados ao LES, como anti-Sm e anti-Ro^{53; 54}.

Além do LES, este vírus vem sendo relacionado a múltiplas doenças autoimunes crônicas¹⁷, como artrite reumatóide⁵⁵, esclerose múltipla^{56; 57}, síndrome de Sjogren^{58; 59}, tireoidite autoimune⁶⁰ e hepatite autoimune⁶¹.

Outro fato importante que vem sendo estudado é o de que a infecção causada pelo EBV em células B promove o aumento da apresentação de sítios de ligação na superfície das células para o herpesvírus humano 6 (HHV-6), aumentando, deste modo, a suscetibilidade a uma superinfecção com o HHV-6⁶². O HHV-6 pode também aumentar as proteínas receptoras de superfície celular, incluindo as para EBV, e isto pode ativar o EBV, saindo da latência e produzindo infecção⁶³. Devido a isto, estudar células B de sangue periférico de pacientes com LES portadores destes dois vírus, EBV e HHV-6, torna-se de extrema importância para o estudo de suas patogenias⁶³.

1.2.2 Citomegalovírus Humano (CMV)

Em 1881, o citomegalovírus (CMV) foi inicialmente identificado observando-se a presença de grandes inclusões celulares no rim de um natimorto com sífilis⁶⁴. Em 1921, observou-se que as alterações descobertas por Ribbert em 1904 eram similares às lesões de pele causadas pela varicela⁶⁵.

O vírus do CMV foi isolado por três pesquisadores, quase que de forma simultânea no ano de 1956: o primeiro isolamento se deu a partir de material proveniente de crianças falecidas com Doença de Inclusão Citomegálica Generalizada⁶⁶; a segunda pesquisa se deu a partir do isolamento de vírus de tecidos de adenóides após adenoidectomia⁶⁷; e a terceira a partir da recuperação do vírus em urina e fígado de crianças com a Doença de Inclusão Citomegálica Generalizada⁶⁸.

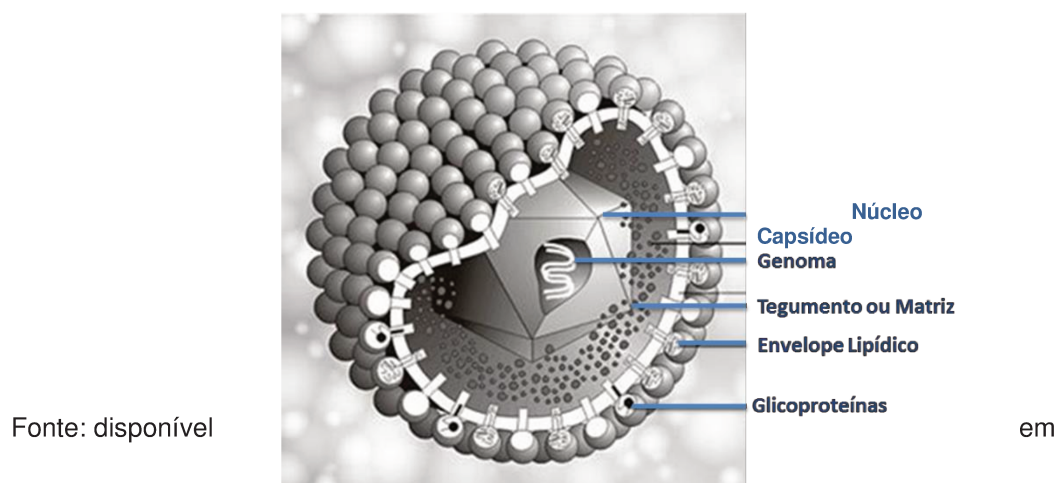
Na década de 60, devido à incidência do CMV em áreas de transplantes, essa infecção passou a ser considerada de grande importância clínica e, a partir de então, o

HMCV foi reconhecido como o principal patógeno em Hospedeiros Imunodeprimidos^{30; 69; 70; 71; 72}.

1.2.2.1 Características Biológicas

O CMV, segundo critérios bioquímicos e morfológicos, foi considerado como um betaherpesvírus pertencente à família Herpes, sendo classificado como Herpesvírus Humano 5 (HHV-5). Como apresentado na Figura 2, abaixo, sua morfologia viral apresenta um formato de nucleocapsídeo icosaédrico, uma estrutura protéica eletrodensa contendo o DNA viral em fita dupla com 230 quilobases, um envelope contendo glicoproteínas virais e um tegumento^{73; 74}.

FIGURA 2 – Estrutura do Citomegalovírus Humano, CMV



<<http://www.biografix.de/CMV/html/metaframe.htm>>. Acesso em 22 jul. 2012.

1.2.2.2 Transmissão

O CMV é um vírus que causa infecção comumente na maioria da população e a prevalência de anticorpos contra o CMV (anti-CMV) eleva-se com a idade, atingindo níveis máximos após os 25 anos⁷⁵. Segundo pesquisas realizadas, em países de alto nível socioeconômico, como nos países europeus e na Áustria, a taxa de contaminação é considerada baixa (40 a 60% de indivíduos infectados); por outro lado, em países de

níveis socioeconômicos mais baixos, a prevalência é significativamente maior (80 a 100% de indivíduos infectados)⁷⁶. No Brasil, a prevalência é de 93%^{69; 77}. A epidemiologia mostra que pacientes imunodeprimidos, como os transplantados e portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e aqueles que são submetidos à quimioterapia, têm maiores riscos de desenvolver a doença por CMV⁶⁹.

As infecções primárias passam, em sua maioria, despercebidas. No entanto, 10% dessas infecções em pacientes imunocompetentes estão associadas à Síndrome da Mononucleose, caracterizada por mal-estar, febre e linfocitose atípica. No organismo, o vírus permanece durante todo o tempo de vida do hospedeiro, de forma latente no endotélio e em células mononucleares do sangue periférico e é controlado pela imunovigilância mediada por células (Nichols; Boeckh, 2000).

A transmissão do CMV ocorre de quatro formas diferentes: pela via parenteral, pelo contato inter-humano, pela via materno-fetal e por transplantes de órgãos⁷⁸. Neste último, existem ainda três padrões epidemiológicos da infecção por CMV: a infecção primária, a reativação de infecção latente e a reinfecção⁷⁹.

Na infecção primária, a fonte viral pode ser pré-natal (transmissão transplacentária)⁸⁰, transfusão intrauterina⁸¹, perinatal (secreção cervical) e pós-natal (urina infectada, saliva, leite materno)⁸⁰, transfusão de sangue e transplante de órgãos⁸². A reativação de infecção latente ocorre após a infecção primária e os vírions infecciosos aparecem na saliva e/ou urina, o que ocorre de forma assintomática⁸³. Ela ocorre pela alteração no relacionamento parasita-hospedeiro devido a um mecanismo fisiológico, como na gravidez (decréscimo natural das defesas imunológicas), nas doenças debilitantes ou no uso de drogas imunossupressoras e procedimentos cirúrgicos⁸³. Já no caso da reinfecção, esta se deve à infecção pelo mesmo tipo viral, porém com um novo vírus antigênico diferente^{82; 84}.

1.2.2.3 Manifestações Clínicas

A doença por CMV apresenta-se bastante parecida com a Mononucleose Infecciosa, quando a infecção por este vírus manifesta-se em pacientes

imunocompetentes. Os sintomas são febre com duração prolongada, fraqueza, sudorese, mialgia, hepatomegalia e/ou esplenomegalia e adenopatia. A icterícia e exantema maculopapular podem ser eventualmente observadas.

Nos exames laboratoriais, o hemograma do paciente com CMV pode apresentar linfocitose relativa e absoluta e um grande número de linfócitos atípicos. Em exames para dosagem das enzimas hepáticas (ALT e AST), é possível que se encontrem resultados com dosagens moderadamente elevadas, fato este que ocorre em 80% dos casos de pacientes acometidos por esta infecção^{75; 85}.

É fundamental o diagnóstico diferencial entre atividade da doença lúpica e infecções virais, lembrando-se da possibilidade da coexistência de ambas, assim como a existência da comorbidade^{5; 86}. Entretanto, o binômio lúpus-infecção por CMV é marcado por uma série de pontos ambíguos e intrigantes, tais como:

Muitas das manifestações clínicas da infecção ativa por CMV confundem-se com as do próprio lúpus, dificultando um diagnóstico diferencial preciso^{28; 31; 87}.

A coexistência de infecção por CMV e LES tem sido descrita na literatura através de relatos de casos e estas descrições demonstram uma dificuldade na separação dos sintomas e sinais de cada uma das doenças^{7; 88; 89; 90}. Ambas causam febre, esplenomegalia, anemia e mialgias⁹¹ e podem causar infiltrados intersticiais nos pulmões⁹², envolvimento do Sistema Nervoso Central, rash cutâneo, anemia hemolítica, leucopenia, trombocitopenia, crioglobulinemia e alterações nas provas de função hepática^{92; 93; 94}. Além da semelhança entre os sintomas, a confusão entre as doenças pode ser aumentada pelo fato de os indivíduos com infecção por CMV apresentarem FAN (fator antinúcleo) e fator reumatóide transitoriamente positivos e pacientes com testes positivos para fator reumatóide poderem apresentar falso IgM positivo para citomegalovírus devido à presença de autoanticorpos relacionados ao lúpus. A elevação de títulos de anticorpos virais tem sido relatada e pode refletir a ativação inespecífica dos linfócitos B⁹³.

Para evitar o risco de resultados sorológicos falso-positivos para CMV, o diagnóstico de infecção ativa deve ser realizado utilizando-se os testes de PCR e antigenemia^{29; 95}.

1.2.3 Herpesvírus Humano 6 (HHV-6)

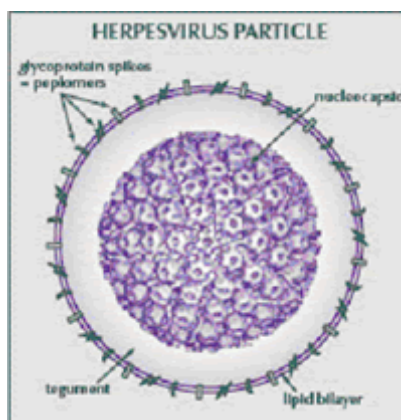
Inicialmente designado como HBLV (human B-lymphotropicvirus), o HHV-6 foi isolado em 1986 de células mononucleares de sangue periférico, estimuladas por interleucina-2 (PBMCs) de pacientes com AIDS ou desordens linfoproliferativas⁹⁶. As culturas de PBMCs exibiram um efeito citopático não usual, caracterizado pelo efeito conhecido como “*balloncell*”, pelo qual o citoplasma atinge grandes volumes, deformando a célula alvo. O agente causador foi identificado através de microscopia eletrônica como um herpesvírus humano, porém sem hibridação cruzada com outro herpesvírus já descrito⁹⁷. As células que propiciam o crescimento destes vírus foram caracterizadas como Linfócitos T CD4+⁹⁸. A designação de HHV-6 foi proposta um ano após a descoberta em acordo com as regras do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus⁹⁹. A cepa GS foi a primeira a ser isolada e posteriormente diversas foram encontradas, perfazendo mais de 100 cepas isoladas de PBMCs de crianças com síndromes febris e exantema súbito¹⁰⁰, de saliva livre de células de pacientes saudáveis ou infectados por HIV¹⁰¹, de pacientes com síndrome de fadiga crônica¹⁰² e de PBMCs de adultos saudáveis¹⁰³.

O HHV-6 é um herpesvírus e possui propriedades biológicas de especificidade do hospedeiro e está classificado na subfamília *Betaherpesviridae* e na família *Herpesviridae*⁹⁵. Embora apresente genoma complexo, o HHV-6 apresenta grande dependência das células hospedeiras¹⁰⁴.

1.2.3.1 Características Biológicas

Assim como os outros herpesvírus, o HHV-6 possui quatro elementos estruturais: core elétron-denso, um capsídeo com simetria icosaédrica, um tegumento e um envelope embebido por glicoproteínas de membrana¹⁰⁵.

FIGURA 3 – Estrutura do Herpesvírus Humano 6, HHV-6



Fonte: disponível em <<http://www.drpodell.org/chronic-fatigue-syndrome-hhv6.shtml>>. Acesso em 22 jul. 2012.

O herpesvírus HHV-6 é um vírus de fita dupla de DNA linear com aproximados 160 Kb⁹⁵, envolvido por um capsídeo icosaédrico constituído por 162 capsômeros e envelopado. A partícula viral envelopada mede cerca de 180 – 200nm de diâmetro¹⁰⁶. Quando sequenciados, os nucleotídeos têm mostrado 66% de similaridade entre a sequência do HHV-6 e CMV¹⁰⁷. O HHV-6 pertence a gênero *Roseolovirus genus* e possui o genoma colinear ao HHV-7. A homologia é de 46,6% a 84,9%.

Devido a sua antigenicidade, conteúdo genético e usando como ferramentas técnicas de biologia molecular e imunológicas enzimas de restrição, PCR e anticorpos monoclonais, o HHV-6 foi classificado em duas variantes: 6A e 6B. A análise de polimorfismos em fragmentos de restrição do genoma do HHV-6 mostra que a variante 6A é representada pelo fenótipo GS ou U1102, uma vez que o tipo 6B está associado ao protótipo Z29¹⁰⁸.

As variantes A e B diferem 8% em nível de nucleotídeo e também nas características clínicas, epidemiológicas e num possível potencial patogênico. Enquanto a variante A tem sido associada a vários sintomas neurológicos, o tipo B implica na maioria dos sintomas associados à infecção pelo HHV-6¹⁰⁹. A variante B é menos citolítica e possui menor alcance que a variante A.

Por ser um vírus linfotrópico, o HHV-6 utiliza o receptor celular CD46 e pode também infectar outras células, como monócitos, células endoteliais, epiteliais¹¹⁰, células da glia e fibroblastos¹¹¹.

1.2.3.2 Transmissão

Quanto à replicação, o ciclo ocorre entre 4 e 5 dias, período em que o vírus pode ser detectado no interior de vacúolos citoplasmáticos e extracelularmente. Em três dias de infecção, o capsídeo e o DNA viral já podem ser observados dentro do núcleo, onde adquirem o tegumento. O envelope é adquirido por brotamento de vacúolos citoplasmáticos, que se fundem à membrana citoplasmática, liberando partículas maduras.

1.2.3.3 Manifestações Clínicas

O HHV-6 parece estar relacionado ao CMV e pode apresentar situações clínicas similares. A infecção primária resulta em exantema súbito, mas outras manifestações clínicas, como convulsões e encefalites, têm sido relatadas¹¹².

Em pacientes imunodeprimidos, as manifestações decorrentes da infecção viral podem ser evidenciadas por efeitos diretos e indiretos:

Diretos → febre e erupções cutâneas; mielossupressão (este vírus vem sendo investigado como causa de supressão de medula óssea; as células brancas do sangue são as mais afetadas, mas outras linhagens de células também podem ser atingidas); pneumonite intersticial; encefalite.

Indiretos → o principal efeito indireto da infecção pelo HHV-6, assim como pelo HHV-7, é o da imunomodulação causada por estes vírus, exacerbando as infecções e doenças causadas por outros herpesvírus e influenciando a ocorrência de outras infecções oportunistas^{113; 114; 115}.

O HHV-6 apresenta várias propriedades imunomodulatórias, como a indução de citocinas, podendo esta propriedade interferir no sistema imune e causar reações alérgico-inflamatórias^{116; 117}.

1.2.4 Herpesvírus Humano (HHV-7)

Em 1990, o Herpesvírus Humano 7 (HHV-7) foi isolado a partir de linfócitos T purificados de células mononucleares de sangue periférico, cepa RK¹¹⁸. Foi relatado mais tarde o isolamento de outra cepa, JI, a partir de células mononucleares de sangue periférico de um paciente portador de Síndrome de Fadiga Crônica¹¹⁹.

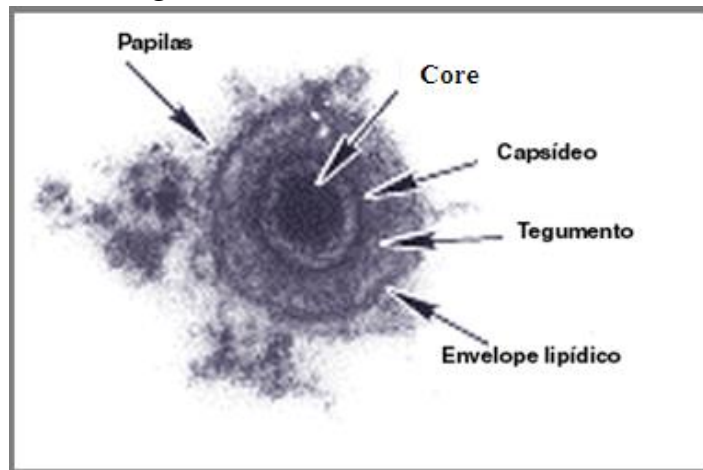
O Herpesvírus Humano 7 é um DNA vírus pertencente ao gênero *Roseolovirus*, família *Herpesviridae*, subfamília *betaherpesvirinae*. O HHV-7 é bastante relacionado ao Herpesvírus Humano 6 (HHV-6) e também bastante similar ao Citomegalovírus Humano (CMV ou HHV-5).

1.2.4.1 Características Biológicas

O genoma do HHV-7 consiste em DNA de fita dupla, linear e de 145 quilobases de tamanho, colinear ao genoma do HHV-6. O vírus HHV-7 compartilha alguns epitopos antigênicos comuns ao HHV-6¹²⁰ e seu genoma é aproximadamente 10% mais curto que o do HHV-6¹²¹.

O HHV-7 possui as mesmas características estruturais dos outros herpesvírus. A ultraestrutura do HHV-7 consiste em uma partícula de cerca de 170 nm de diâmetro com nucleocapsídeo de 90-95 nm e tegumento de 30 nm, aproximadamente.

FIGURA 4 – Fotomicrografia eletrônica do HHV-7 exibindo sua ultraestrutura ¹²²



Fonte: ABLASHI, et. al., 1998.

O HHV-7 é um vírus linfotrópico com tropismo para células CD4⁺, especialmente para linfócitos T-CD4⁺. Uma vez que o receptor CD4 é necessário, mas não suficiente para a internalização do vírus na célula. Tem sido proposto que proteoglicanas sulfatadas de superfície celular são capazes de se ligar a uma proteína do HHV-7, homóloga à Glicoproteína B (gB) do HSV-1 (Herpesvírus Humano 1 ou Herpesvírus simples 1). Esta ligação precede a interação com os receptores CD4 de superfície celular.

Estudos em culturas de células mononucleares periféricas estimuladas demonstraram que a replicação do HHV-7 pode induzir a reativação do HHV-6 *in vitro* ¹²¹. Alguns trabalhos têm sugerido que isso ocorre também *in vivo* em pacientes imunodeprimidos¹²³.

1.2.4.2 Transmissão

São cinco as formas de transmissão do HHV-7:

- ✓ A primo-infecção incide em idades entre 5 e 6 anos de vida. A infecção pelo HHV-7 pode ocorrer mais cedo em regiões tropicais como o Brasil¹²⁴.
- ✓ A transmissão horizontal se dá, provavelmente, através da saliva¹²⁵.

✓ A transmissão vertical pode ser resultado da passagem pela placenta ou de forma hereditária após integração do seu genoma nos cromossomos gaméticos do hospedeiro, assim como acontece com o HHV-6.

✓ Transmissão após o parto através do leite materno é outra possibilidade para o HHV-7¹²⁶.

✓ Transmissão nosocomial/iatrogênica pode ocorrer através de órgãos transplantados, transfusão de sangue, células progenitoras hematopoiéticas, causando infecção primária ou infecção recorrente¹²⁰.

As infecções causadas pelo HHV-7 são definidas como:

✓ Infecção Primária ou Primo-Infecção: ocorre no primeiro contato com uma das cepas do HHV-7.

✓ Reinfecção: ocorre quando o indivíduo entra em contato com uma cepa diferente da pela qual foi anteriormente infectado.

✓ Infecção Latente: é definida pela persistência do genoma do HHV-7 nas células do hospedeiro.

✓ Reativação: é definida pela replicação do genoma viral a partir do estado de latência.

Quanto às infecções acima relacionadas, estas são definidas como ativas pela replicação do vírus na célula do hospedeiro e liberação de vírus para o espaço extracelular. A infecção ativa pode estar ligada à fase aguda da infecção primária ou à reativação de uma infecção latente¹²⁷.

1.2.4.3 Manifestações Clínicas

Como os outros herpesvírus, o HHV-7 pode estabelecer infecção latente por toda a vida do indivíduo e se reativar durante um estado de imunossupressão¹²⁸.

O grau de imunossupressão em pacientes farmacologicamente imunodeprimidos parece estar diretamente relacionado aos fatores que controlam a reativação do HHV-7. Sugere-se que os fatores que controlam a reativação ou o aumento da replicação do

CMV em indivíduos imunodeprimidos podem ser similares aos identificados para o HHV-7¹²³.

Um fator que pode causar confusão na análise do HHV-7 em sangue periférico e em outros tecidos usando PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) é a detecção potencial de infecção latente^{129; 130}. Contudo, a detecção do DNA do HHV-7 em soro ou plasma é indicativa de replicação viral ativa^{130; 131; 132; 133}.

1.2.4.4 Indivíduos Imunocompetentes

A *Roseola infantum* é uma síndrome exantemática caracterizada, classicamente, por febre alta e erupção cutânea, principalmente em crianças menores. A infecção é, por vezes, acompanhada de plaquetopenia e, tipicamente de leucopenia. É importante salientar que a maioria dos casos de exantema súbito é causada pela variante B do HHV-6 e um segundo episódio de exantema súbito pode ocorrer provocado pelo HHV-7. A infecção pelo HHV-7 pode ocorrer antes do HHV-6, embora isto seja menos comum¹²⁰. Normalmente, a doença é efetivamente controlada pelo sistema imune sem deixar sequelas.

Convulsões, encefalite e encefalopatia têm sido associadas a doenças febris causadas pelo HHV-7 e HHV-6 bem antes do exantema súbito ser clinicamente caracterizado no paciente. Relação entre infecção primária pelo HHV-6 subtipo B e as manifestações acima descritas foi confirmada por alguns autores¹³⁴, mas para o HHV-7 foi bem menos documentada¹³⁵.

1.2.4.5 Indivíduos Imunodeprimidos

O HHV-7 mantém latência, com baixo nível de replicação viral, após a infecção primária, podendo reativar-se após um período de disfunção imune. Após imunossupressão farmacológica, o HHV-7 pode se reativar e a replicação viral prosseguir de forma clinicamente benigna. Apesar de até o momento não haver provas sobre efeitos patogênicos do HHV-7, não está descartada a possibilidade de manifestações clínicas diretas ou indiretas.

A forma mais comum de manifestação do HHV-7 é a reativação endógena. Ou seja, a persistência natural da infecção primária com baixo nível de replicação e a subsequente reativação no indivíduo na fase de imunossupressão.

2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Poucos estudos têm avaliado o impacto das infecções virais em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES). Nossa meta com este estudo foi verificar a presença de infecções causadas pelos herpesvírus em pacientes com LES ativo e não ativo. Utilizamos, para isso, técnicas rápidas e sensíveis para a detecção da infecção ativa causada pelos herpesvírus, tais como a Nested-PCR e a antigenemia, avaliando a influência dessas viroses no diagnóstico, prognóstico e tratamento do LES.

3 OBJETIVOS

Ao analisar amostras de sangue periférico de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico acompanhados pela Disciplina de Reumatologia do Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, nossos objetivos foram:

- Verificar a presença do DNA e do antígeno *pp65* do CMV, utilizando as técnicas Nested-PCR e antigenemia, respectivamente, em amostra de sangue;
- Verificar a presença de DNA do EBV, HHV-6 (A/B) e HHV-7, utilizando a técnica de Nested-PCR em DNA extraído de soro;
- Verificar o impacto clínico causado pela infecção ativa e doença por CMV nos pacientes estudados e a possibilidade de coinfeção com outros herpesvírus (EBV, HHV-6 e HHV-7).

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Casuística

Foram estudados, prospectivamente, 71 pacientes com diagnóstico de LES que estavam recebendo terapia imunossupressora e em seguimento na enfermaria e no ambulatório da Disciplina de Reumatologia, Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP.

Dos 71 pacientes foram coletados, 4 ml de sangue em tubos contendo anticoagulante EDTA e 8 ml de sangue em tubo seco. As coletas foram realizadas por profissionais da área de Enfermagem do referido Hospital e somente ocorreram mediante o consentimento do paciente ou de seu responsável, através de assinatura do Termo de Consentimento Pós-Informação (ANEXO 2), concordando com os objetivos do projeto a ser realizado. Foram utilizados os seguintes critérios para inclusão e exclusão dos pacientes no estudo:

4.1.1 Critérios para inclusão dos pacientes no estudo

1. Pacientes com diagnóstico de LES;
2. Consentimento do paciente ou responsável autorizando a coleta das amostras de sangue para o estudo;
3. Análise laboratorial das amostras de soro e sangue de pacientes com LES em relação à presença de infecção ativa e/ou doença por EBV, CMV, HHV-6, HHV-7.

4.1.2 Critérios de suspensão ou encerramento

1. Foram excluídos os pacientes que não completaram os itens anteriormente descritos;
2. Em caso de óbito do paciente, logo após a inclusão no estudo.

4.1.3 Critérios para Caracterização de Atividade Lúpica

Considerou-se atividade lúpica quando o SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index* - Índice de Atividade de Doença por Lúpus Eritematoso Sistêmico)

dos pacientes foi igual ou superior a 8, como preconiza o Colégio Americano de Reumatologia (ANEXO 1).

4.1.4 Critérios para Caracterização de Infecção Ativa pelos herpesvírus

Nos pacientes estudados, considerou-se infecção ativa pelo CMV a presença de 1 (uma) célula *pp65* antígeno positiva, antigenemia e/ou um resultado de Nested-PCR positivo; para EBV, HHV-6 e HHV-7 foi considerada uma amostra positiva detectada pela técnica de Nested-PCR em DNA extraído de soro.

4.1.5 Graus de Imunossupressão

O grau de imunossupressão utilizado nos pacientes foi categorizado em quatro níveis, sendo eles:

0 – Sem imunossupressão → Concentrações de Prednisona menores que 5mg/dia;

1 – Imunossupressão leve → Concentrações de Prednisona maiores ou iguais a 5mg/dia e menores que 30mg/dia;

2 – Imunossupressão moderada → Concentrações de Prednisona maiores ou iguais a 30mg/dia e menores ou iguais a 59mg/dia;

3 – Imunossupressão elevada → Concentrações de Prednisona maiores ou iguais a 60mg/dia e/ou qualquer concentração dos seguintes fármacos: Azatioprina, Ciclofosfamida, Metotrexato, MicofenolatoMofetil e pulsoterapia com Metilprednisolona.

4.1.6 Sigilo dos Dados Obtidos

Os nomes dos pacientes a serem incluídos no estudo foram e serão mantidos em sigilo, não sendo registrados em qualquer tipo de publicação ou na dissertação de Mestrado referente a este projeto.

4.2 Métodos Laboratoriais e Tipos de Amostras Utilizadas no Diagnóstico de Infecção Ativa

A Tabela 3 mostra os herpesvírus estudados, as técnicas e os tipos de amostras utilizadas.

TABELA 3 – Tipos de amostras e técnicas utilizadas para detecção de infecção ativa pelos herpesvírus em estudo

Herpesvírus	Amostra	Técnica Utilizada
EBV	DNA - Soro	Nested-PCR
CMV	Leucócitos	Antigenemia
	DNA - Leucócitos	Nested-PCR
HHV-6	DNA - Soro	Nested-PCR
HHV-7	DNA - Soro	Nested-PCR

Fonte: elaboração própria.

4.2.1 Detecção de Infecção Ativa Pelo Epstein-Barr

Nested-PCR (soro) – A Nested-PCR seguiu o método descrito para CMV, com algumas modificações.

TABELA 4 – Sequência dos primers utilizados na Nested-PCR para a EBV

Primers Externos	Sequências (5' → 3')	Fragmento
EBV/1+	CGAGTCATCTACGGGGACACGGA	194pb
EBV/1-	AGCACCCCCACATATCTCTTCTT	
Primers Internos	Sequências (5' → 3')	Fragmento
EBV/2+	ACCCGGAGCCTGTTTGTAGC	54pb
EBV/2-	GGAGAAGGTCTTCTCGGCCTC	

Fonte: elaboração própria

TABELA 5 – Concentrações de reagentes e ciclos utilizados durante a Reação em Cadeia da Polimerase tipo Nested(N-PCR) – 35ciclos

1ª Reação	[]	35 Ciclos
H2O	6,0 µL	Denaturação Inicial 95°C – 2 min. Denaturação 95°C – 30 seg. Anelamento 60°C – 30 seg. Extensão 70°C – 1 min.
Master Mix*	10,0 µL	
Primer EBV/1+	10,0 pmol	
Primer EBV/1-	10,0 pmol	
DNA	10,0 ng/µL	
2ª Reação	[]	35 Ciclos
H2O	6,0 µL	Denaturação Inicial 95°C – 2 min. Denaturação 95°C – 30 seg. Anelamento 60°C – 30 seg. Extensão 70°C – 1 min.
Master Mix*	10,0 µL	
Primer EBV/2+	10,0 pmol	
Primer EBV/2-	10,0 pmol	
DNA (1ª Reação)	10,0 ng/µL	

* GoTaq® Green Master Mix (PROMEGA)

Fonte: elaboração própria

4.2.2 Detecção de Infecção Ativa Pelo Citomegalovírus

4.2.2.1 Antigenemia

A Antigenemia (detecção do antígeno pp65 do CMV) seguiu o método descrito, com algumas modificações^{136; 137; 138; 139}, sendo utilizado o Kit CMV Brite Turbo, fabricado por IQ Products (Netherlands), distribuído por DPM Diagnóstica.

4.2.2.1.1 Preparação da Suspensão de Leucócitos

1. Diluir solução de Lise 1:10 em água destilada (4°C);
2. Misturar 1mL de sangue periférico e completar para 15mL com solução de lise, incubar por 15 min. A 4°C;
3. Centrifugar por 3 min. A 2500 rpm. Desprezar o sobrenadante;
4. Repetir lise se a primeira não for suficiente, por 5 min;
5. Ressuspender o pellet em 5mL de PBS;

6. Centrifugar por 3min. A 2500 rpm. Desprezar o sobrenadante;
7. Ressuspender o pellet em 0,5 mL de PBS.

4.2.2.1.2 Contagem e Concentração de Células

1. Utilizar hemocítômetro, contador automático celular ou Câmara de Neubauer;
2. Ajustar concentração em 2×10^6 células por mL com PBS.

4.2.2.1.3 Preparação de Lâminas de Citocentrifugado

1. Centrifugar 100 μ L da suspensão celular a 600 rpm. Por 4 min. Em lâminas de vidro na citocentrífuga;
2. Secar as lâminas por 20 min;
3. Circundar o citocentrifugado com caneta hidrofóbica.

4.2.2.1.4 Fixação e Permeabilização

1. Diluir Fixador (Reagente B) 1:5 em PBS – frasco escuro;
2. Diluir Permeabilizador (Reagente C) 1:5 em PBS – frasco escuro;
3. Imergir as Lâminas no fixador diluído por 5 min. a temperatura ambiente em câmara escura;
4. Lavar as lâminas 3 vezes com PBS e na terceira deixá-las imersas por 3min;
5. Imergir as lâminas na solução de permeabilização diluída por 1 min. a temperatura ambiente em câmara escura;
6. Lavar as Lâminas 3 vezes com PBS e na terceira deixá-las imersas por 5 min.

4.2.2.1.5 Coloração por Imunofluorescência

1. Aplicar 35 μ L do anticorpo monoclonal primário e incubar por 20 min. a 37°C em câmara úmida e escura;
2. Lavar as lâminas 3 vezes com PBS na terceira deixa-las imersas por 3min;

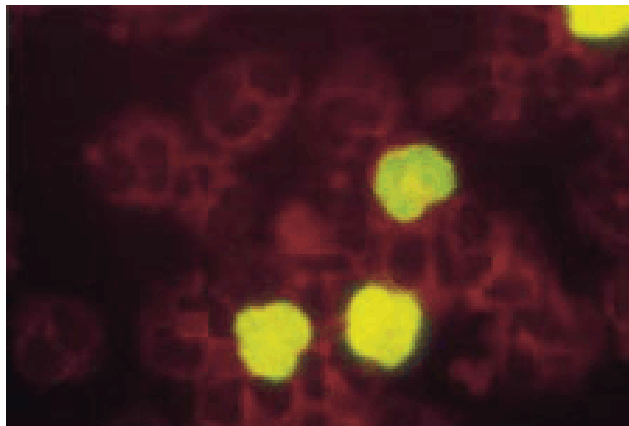
3. Aplicar 35 μ L do anticorpo conjugado e incubar por 20 min. a 37°C em câmara úmida e escura;
4. Lavar 2 vezes com PBS e retirar o excesso;
5. Montar a Lâmina com glicerina tamponada e cobrir com lamínula.

4.2.2.1.6 Leitura das Lâminas

1. Utilizar microscópio de fluorescência usando aumento de 400x;
2. Células Positivas apresentam coloração verde-amarelada;
3. Células negativas apresentam coloração avermelhada.

4.2.2.1.7 Células Positivas e Negativas

FIGURA 5 – Leituras das lâminas em microscópio óptico



Fonte: autoria própria, máquina fotográfica marca NIKON - Eclipse E200

Células positivas → coloração verde-amarelada.

Células negativas → coloração avermelhada.

4.2.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase tipo Nested

a) Extração de DNA (leucócitos e soro) – a técnica de extração de DNA de leucócitos de sangue total e soro foram realizadas através do método descrito por Sambrook *et al.* 1989¹⁴⁰.

b) Nested-PCR – A Reação em Cadeia da Polimerase em leucócitos e soro seguiu o método descrito por Shibata *et al.* 1988¹⁴¹, com algumas modificações. Foram utilizados dois pares de iniciadores que flanqueiam uma região conservada nas diversas cepas de vírus CMV, não amplificando DNA de outros herpesvírus.

TABELA 6 – Sequência dos primers externos e internos que flanqueiam uma região conservada do genoma do CMV, utilizados na PCR e na Nested-PCR

Primers Externos	Sequências (5' → 3')	Fragmento
MIE 4	CCAAGCGGCCTCTGATAACCAAGCC	435pb
MIE 5	CAGCACCATCCTCCTCTTCCTCTGG	
Primers Internos	Sequências (5' → 3')	Fragmento
IE 1	CCACCCGTGGTGCCAGCTCC	159pb
IE 2	CCCGCTCCTCCTGAGCAC CC	

Fonte: elaboração própria

TABELA 7 – Concentrações de reagentes e ciclos utilizados durante a Reação em Cadeia da Polimerase tipo Nested (N-PCR) – 30 ciclos

1ª Reação	[]	30 Ciclos
H2O	6,0 µL	Denaturação Inicial 95°C – 3 min. Denaturação 95°C – 1 min. Anelamento 55°C – 1 min. Extensão 72°C – 1 min.
Master Mix*	10,0 µL	
Primer MIE4	10,0 pmol	
Primer MIE5	10,0 pmol	
DNA	10,0 ng/µL	
2ª Reação	[]	30 Ciclos
H2O	6,0 µL	Denaturação Inicial 95°C – 2 min. Denaturação 95°C – 30 seg. Anelamento 57°C – 45 seg. Extensão 72°C – 1 min.
Master Mix*	10,0 µL	
Primer IE 1	10,0 pmol	
Primer IE 2	10,0 pmol	
DNA (1ª Reação)	10,0 ng/µL	

* GoTaq® Green Master Mix

Fonte: elaboração própria

4.2.3 Detecção de Infecção Ativa Pelo Herpesvírus Humano 6

Nested-PCR (soro) – a Nested-PCR seguiu o método descrito por Sechiero *et al.* 1995¹⁴² para HHV-6, com algumas modificações.

TABELA 8 – Sequência dos primers utilizados na Nested-PCR para HHV-6

Primers Externos	Sequências (5' → 3')	Fragmento
EX-1	GCGTTTTTCAGTCTGTAGTTCGGCAG	520 pb
EX-2	TGGCCGCATTTCGTACAGATACGGAGG	
Primers Internos	Sequências (5' → 3')	Fragmento
IN-3	GCTAGAACGTATTTGCTGCAGAACG	258 pb
IN-4	ATCCGAAACAACGTGTCTGACTGGCA	

Fonte: elaboração própria

TABELA 9 – Concentração de Reagentes e Ciclos utilizados durante a Reação em Cadeia da Polimerase tipo Nested (N-PCR) – 30 ciclos

1ª Reação	[]	30 Ciclos
H2O	6,0 µL	Denaturação Inicial 95°C – 3 min. Denaturação 95°C – 1 min. Anelamento 56°C – 1 min. Extensão 72°C – 1 min.
Master Mix*	10,0 µL	
Primer EX-1	10,0 pmol	
Primer EX-2	10,0 pmol	
DNA	10,0 ng/µL	
2ª Reação	[]	30 Ciclos
H2O	6,0 µL	Denaturação Inicial 95°C – 2 min. Denaturação 95°C – 1 min. Anelamento 62°C – 1 min. Extensão 72°C – 1 min.
Master Mix*	10,0 µL	
Primer IN-1	10,0 pmol	
Primer IN-2	10,0 pmol	
DNA (1ª Reação)	10,0 ng/µL	

* GoTaq® Green Master Mix

Fonte: elaboração própria.

4.2.4 Detecção de Infecção Ativa Pelo Herpesvírus Humano 7

Nested-PCR (*soro*) – as PCR's para o HHV-7 seguiram o método descrito por Pozo *et al.* 1999¹⁴³ para HHV-7, com algumas modificações (originalmente, um Multiplex-PCR).

TABELA 10 – Sequência de primers utilizados na Nested-PCR para HHV-7

Primers Externos	Sequências (5' → 3')	Fragmento
HHV-7/1+	GAGGTGATTTATGGTGATACTGA	194pb
HHV-7/1	AAC TTTCCAATGTAACGTTTCTT	
Primers Internos	Sequências (5' → 3')	Fragmento
HHV-7/2+	GTTACTTTCAAAAATGTTTGTCCC	122pb
HHV-7/2	GGAAATAGGATCTTTTCAAATTC	

Fonte: elaboração própria.

TABELA 11 – Concentrações de reagentes e ciclos utilizados durante a Reação em Cadeia da Polimerase tipo Nested (N-PCR) – 30 ciclos

1ª Reação	[]	30 Ciclos
H2O Master Mix* Primer HHV-7/1+ Primer HHV-7/1 DNA	7,0 µL 13,0 µL 10,0 pmol 10,0 pmol 10,0 ng/µL	Denaturação Inicial 95°C – 3 min. Denaturação 95°C – 45 seg. Anelamento 57°C – 45 seg. Extensão 72°C – 1 min.
2a Reação	[]	30 Ciclos
H2O Master Mix* Primer HHV-7/2+ Primer HHV-7/2 DNA (1a Reação)	7,0 µL 13,0 µL 10,0 pmol 10,0 pmol 10,0 ng/µL	Denaturação Inicial 95°C – 2 min. Denaturação 95°C – 45 seg. Anelamento 57°C – 45 seg. Extensão 72°C – 1 min.

* GoTaq® Green Master Mix

Fonte: elaboração própria.

4.2.5 Detecção do Gene da β -Globina Humana

A amplificação de um fragmento do gene da β -Globina humana foi utilizada para checar a qualidade do DNA em todas as amostras testadas e seguiu o método para PCR simples ¹⁴⁴.

TABELA 12 – Sequência de primers que flanqueiam uma região conservada do gene da β - Globina utilizados na PCR

Primers	Sequência (5' → 3')	Fragmento
PCO3	ACACAACGTGTGTTCACTAGC	110pb
PCO4	CAACTTCATCCACGTTTCACG	

Fonte: elaboração própria.

TABELA 13 – Concentrações de reagentes e ciclos utilizados durante a Reação em Cadeia da Polimerase – 40 ciclos

1ª Reação	[]	40 Ciclos
H2O	6,0 µL	Denaturação Inicial 94°C – 3 min. Denaturação 94°C – 30 seg. Anelamento 55°C – 1 min. Extensão 72°C – 2 min.
Master Mix*	11,0 µL	
Primer PCO3	10,0 pmol	
Primer PCO4	10,0 pmol	
DNA	10,0 ng/µL	

* GoTaq® Green Master Mix

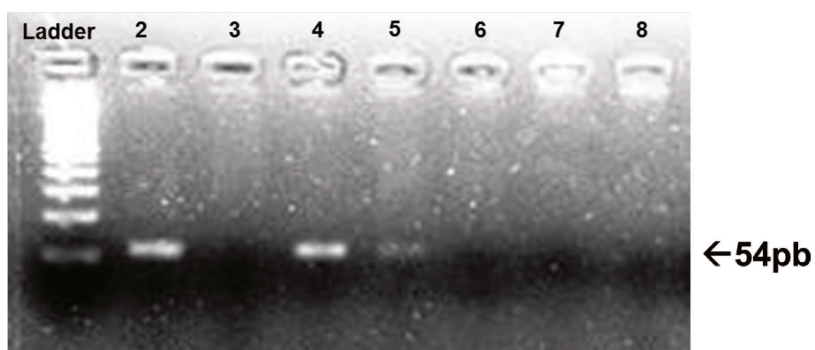
Fonte: elaboração própria

4.2.6 Visualização dos Fragmentos Amplificados Pela Nested-PCR

A visualização das bandas foi realizada após a aplicação de 5-10 µl do produto da segunda PCR de cada vírus em gel de Agarose a 2% em tampão TEB 0,5x (TRIS-EDTA-BORATO), contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio e submetida à eletroforese 30 minutos a 100 Volts. Após a corrida eletroforética, os géis foram visualizados à luz ultravioleta para a comprovação das bandas, usando um padrão de peso molecular de 50 e 100 pb (DNA-Ladder, Gibco-BRL). Os tamanhos dos fragmentos amplificados dos herpesvírus CMV, EBV, HHV-6 (A/B) e HHV-7 foram de 159, 54, 258/658, e 122 pares de bases, respectivamente.

4.2.6.1 Epstein-Barr Virus - EBV

FIGURA 6 – Eletroforese em gel de agarose de produtos da Nested-PCR para EBV



Fonte: autoria própria.

8 amostras, reveladas com brometo de etídio e fotografadas sob luz UV:

Coluna 1, padrão de peso molecular (Ladder-50pb);

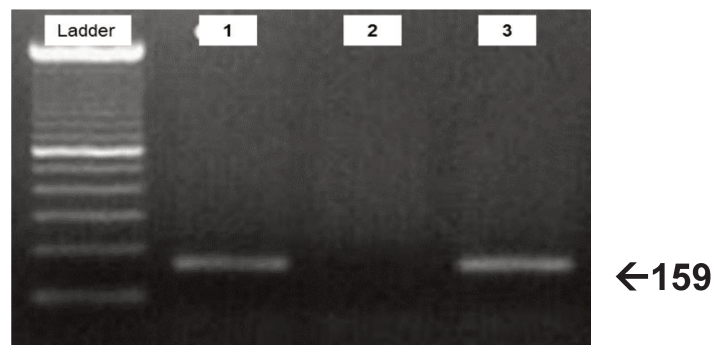
Colunas 3-6-7-8, indicam amostras negativas;

Colunas 4-5, amostras positivas;

Colunas 2 e 8, controles positivo e negativo, respectivamente.

4.2.6.2 Citomegalovírus - CMV

FIGURA 7 – Eletroforese em gel de agarose de produtos da Nested-PCR para CMV reveladas com brometo de etídio e fotografadas sob luz UV



Fonte: autoria própria.

Padrão de peso molecular (Ladder-100pb);

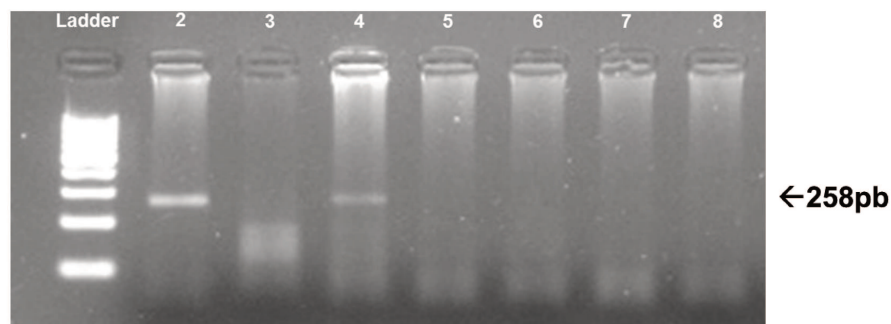
Coluna 1, controle positivo;

Coluna 2, controle negativo;

Coluna 3, amostra positiva.

4.2.6.3 Herpesvírus Humano 6 – HHV-6

FIGURA 8 – Eletroforese em gel de agarose de produtos da Nested-PCR para HHV-6 de 1 amostra positiva, reveladas com brometo de etídio e fotografadas sob luz UV



Fonte: autoria própria.

Coluna 1, padrão de peso molecular (Ladder-100pb);

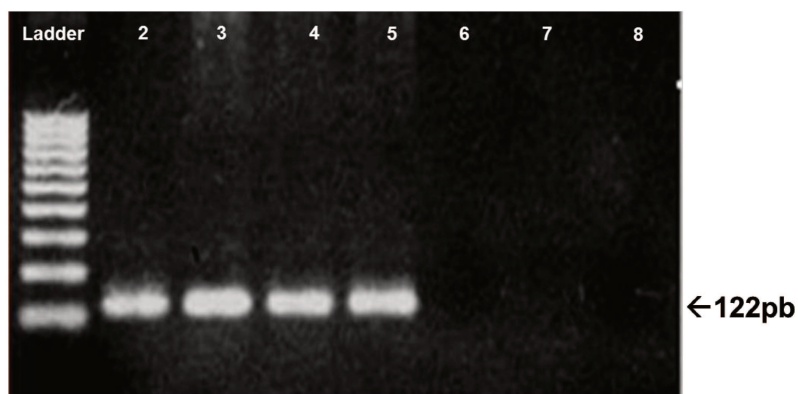
Colunas 2 e 8, controle positivo e negativo respectivamente;

Colunas 3-5-6-7, amostras negativas;

Coluna 3, amostra positiva.

4.2.6.4 Herpesvírus Humano 7 – HHV-7

FIGURA 9 – Eletroforese em gel de agarose de produtos da nested-PCR para HHV-7 de 4 amostras positivas, reveladas com brometo de etídio e fotografadas sob luz UV



Fonte: autoria própria.

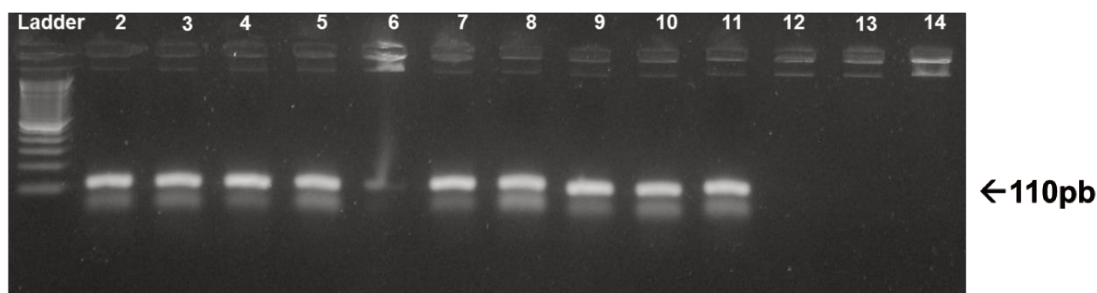
Coluna 1, padrão de peso molecular (Ladder-100pb);

Colunas 2-5, indicam amostras positivas;

Colunas 6-8, amostras negativas.

4.2.6.5 Gene da β -Globina Humana

FIGURA 10 – Eletroforese em gel de agarose de produtos da PCR para β -Globina de 8 amostras positivas, reveladas com brometo de etídio e fotografadas sob luz UV



Fonte: autoria própria.

Coluna 1, padrão de peso molecular (Ladder-100pb);

Colunas 3-5/7-11, indica amostras positivas;

Colunas 12-13, amostras negativas;

Colunas 2 e 14, controles positivo e negativo, respectivamente.

4.3 Biossegurança

O laboratório está atuando desde o dia vinte e nove de abril do ano de dois mil e oito de acordo com a Vigilância Sanitária e está adequado para o funcionamento através da emenda que estabelece regulamento Técnico de Produtos para Diagnóstico de uso *in vitro* e seu registro, cadastramento, e suas alterações, revalidações e cancelamento tendo como órgão emissor a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através das Resoluções RDC 206, de 17 de novembro de 2006 e RDC 302 de 13 de outubro de 2005.

Precauções Padrão: para o desenvolvimento do trabalho, entramos em contato com material biológico. Sangue e outros fluídos corporais podem alojar microrganismos e, por isso, consideramos estes fluídos contaminados por agentes transmissores de

doenças. Sempre conscientes da importância de proteção na manipulação destes materiais, artigos, resíduos e ambientes. Para isso, utilizamos as precauções padrão:

- Uso sistemático de EPI, de acordo com os procedimentos a serem realizados e específicos para este fim;
- Atenção para riscos ao manipular, preparar, recolher, transportar ou limpar materiais perfurocortantes usados;
- Cuidados ao desprezar material perfurocortante de único uso em contentor adequado (EPC);
- Descarte sistematizado de material usado, de acordo com as Normas Regulatórias.

4.4 Análise Estatística

A análise estatística das variáveis categóricas foi realizada utilizando o teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Um valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

5.1 Característica dos Pacientes Incluídos no Estudo

Participaram do protocolo de monitorização 71 pacientes portadores de LES, sendo todos do sexo feminino. A mediana da idade dos pacientes foi de 40 anos (variação de 18 a 62 anos). Dentre os pacientes estudados, 20/71 (28,16%) tinham doença lúpica em atividade (SLEDAI acima de 8). Os outros 51/71 (71,83%) pacientes do estudo não apresentaram atividade para LES (Tabela 15).

TABELA 14 – Características dos 71 pacientes incluídos no estudo

Características dos Pacientes	N (%)
Número de Pacientes	71 (100%)
Sexo	71 fem. (100%)
Idade (Mediana)	40 anos (range 18-78)
Com Atividade Lúpica (SLEDAI $\geq$ 8)	20 (28,17%)
Sem Atividade Lúpica (SLEDAI <8)	51 (71,83%)

Fonte: elaboração própria.

5.2 Total De Exames Realizados Durante A Monitorização

Foram realizados, neste estudo, 355 exames para a detecção de infecção ativa pelos herpesvírus anteriormente descritos, incluindo Nested-PCR e Antigenemia nos 71 pacientes estudados. A Tabela 14 mostra o total de exames realizados durante o estudo.

TABELA 15 – Total de exames realizados durante o estudo

Exames	Material	Positivos	Negativos	Total
Nested PCR - CMV	DNA Leucócitos	6 (8,5%)	65 (91,5%)	71
Antigenemia	Leucócitos	6 (8,5%)	65 (91,5%)	71
Nested PCR - HHV-6	DNA Soro	0 (0%)	71(100%)	71
Nested PCR - HHV-7	DNA Soro	6 (8,5%)	65 (91,5%)	71
Nested PCR - EBV	DNA Soro	0 (0%)	71(100%)	71
Total		18 (5,1%)	337 (94,9%)	355

Fonte: elaboração própria.

5.3 Ocorrência de Infecção Ativa causada pelos Herpesvírus nos pacientes estudados e atividade lúpica

Infecção ativa causada pelos herpesvírus estudados foi encontrada em 10/71 (14,08%) dos pacientes. Destes, 6/10 (60%) apresentaram infecção ativa causada pelo CMV, 6/10 (60%) tiveram infecção ativa causada pelo HHV-7, sendo que 2/10 (20%) pacientes apresentaram coinfecção por CMV e HHV-7.

Observamos que nos pacientes com LES ativo (SLEDAI igual ou maior que 8), 20/71 (28,16%), a infecção ativa ocorreu em 10/20 (50%) e nos pacientes com LES sem atividade, 51/70 (71,83%), apenas um paciente, 1/51 (1,96%) apresentou infecção ativa pelos herpesvírus CMV e HHV-7 concomitantemente. Esta diferença de ocorrência de infecção ativa detectada entre os dois grupos de pacientes foi estatisticamente significativa ($p<0,0001$) (Tabela 16).

TABELA 16 – Pacientes com Infecção Ativa causada pelos Herpesvírus estudados, grau de imunossupressão e fármaco utilizado

Paciente	Atividade Viral	SLEDAI	Grau de Imunossupressão	Fármaco utilizado
1	CMV/HHV-7	12	3	Metotrexato
2	CMV	12	3	Azatioprina
3	CMV	8	3	Azatioprina
4	HHV-7	8	3	Azatioprina
5	CMV	10	3	Pulsosde Metilprednisolona
6	HHV-7	10	3	Azatioprina
7	HHV-7	8	3	Azatioprina
8	CMV	11	2	Prednisona 0,5 - 0,9 mg/Kg/dia
9	HHV-7	10	1	Prednisona 0,08 - 0,5mg/Kg/dia
10	CMV/HHV-7	4	3	Metotrexato

Fonte: elaboração própria.

5.4 Relato dos casos dos 10 pacientes que apresentaram infecção ativa causada pelos herpesvírus estudados

1-) **20 anos** → Diagnóstico de LES. Apresentava vasculite do sistema nervoso central. A paciente encontrava-se com LES em atividade, SLEDAI 12 (Síndrome Orgânica Cerebral – Leucocitúria). Fez uso de Prednisona. Em relação à infecção ativa por herpesvírus. Apresentou coinfeção por CMV e HHV-7.

2-) **45 anos** → Diagnóstico de LES há 8 anos. Foi internada apresentando edema de membros inferiores e edema de face intenso há 15 dias, febre, vômitos e diarreia. A

paciente encontrava-se com LES em atividade, SLEDAI 12 (Hematuria - Proteinúria - Hipocomplementemia - Aumento do Título de DNA). Recebeu ganciclovir para o tratamento da infecção e para tratamento do LES, pulso de ciclofosfamida e metilprednisolona. Melhorou após o tratamento. Apresentou infecção ativa pelo CMV.

3-) **24 anos** → Diagnóstico de LES. Encontrava-se com a doença em atividade, SLEDAI 8 (Cilindros Urinários – Proteinúria). Também apresentou hipertensão arterial sistêmica. Utilizou Prednisona, Azatioprina. Apresentou Infecção ativa pelo CMV.

4-) **41 anos** → Diagnóstico de LES há 15 anos a paciente encontrava-se com LES em atividade, SLEDAI 8 (Cilindros Urinários – Proteinúria). Apresentou Nested-PCR positiva para HHV-7.

5-) **31 anos** → Diagnóstico de LES. Encontrava-se com a doença em atividade SLEDAI 10 (Proteinúria - Úlceras Mucosas - Aumento do Título de DNA - Febre – Leucopenia), deu entrada na enfermaria precisando ser entubada por insuficiência respiratória aguda e febre. Foi internada com edema generalizado, taquipneia e febre. Recebeu prednisona 100mg, metilprednisona e ciclofosfamida. Evoluiu para óbito por sepse de foco pulmonar e insuficiência de múltiplos órgãos. Apresentou positividade para CMV.

6-) **27 anos** → Diagnóstico de LES há 16 anos deu entrada no Pronto Socorro referindo alterações cutâneas. A paciente encontrava-se com LES em atividade SLEDAI 10 (Hematuria - Leucocitúria - Plaquetopenia – Leucopenia). Recebeu pulsoterapia de ciclofosfamida. Ficou internada apresentando septicemia grave e choque refratário evoluindo para óbito. Biópsia pericárdica positiva para *Pseudomonas aeruginosa*. Nested-PCR positivo para HHV-7.

7-) **33 anos** → Diagnóstico de LES há 5 anos. A paciente encontrava-se com LES em atividade, SLEDAI 8 (Cefaléia. Episódios esporádicos de cefaleia). Nested-PCR positivo para HHV-7.

8-) **43 anos** → Diagnóstico de LES há 1 ano. Internada dia 26/11/2008 devido à infecção no trato urinário. A paciente encontrava-se com LES em atividade, SLEDAI 11

(Hematúria - Leucocitúria – Plaquetopenia). Recebeu alta com uso de ciprofloxacina em casa e retorno em dezembro de 2008 para pulso de CFO. Diagnóstico de LES disseminado (sistêmico) com comprometimento de outros órgãos e sistemas. Infecção Ativa por CMV.

9-) **48 anos** → Diagnóstico de LES há 18 anos. A paciente encontrava-se com LES em atividade, SLEDAI 10 (Cefaléia Lúpica - Plaquetopenia – Leucopenia). Queixa de dores de cabeça, às vezes muito fortes e súbitas, às vezes progressiva. Nested-PCR positivo para HHV-7.

10-) **34 anos** → Diagnóstico de LES há 21 anos. A paciente encontrava-se com LES inativo, SLEDAI 4 (Artrite). Voltou a tomar Metotrexato há 3 meses devido a dores articulares. Coinfecção por CMV e HHV-7.

6 DISCUSSÃO

A infecção ativa pelos herpesvírus humanos é uma ocorrência muito frequente em pacientes imunodeprimidos^{130; 139; 145}. Pacientes com doenças autoimunes, tais como os com Lúpus Eritematoso Sistêmico tem um risco aumentado de serem acometidos por estas infecções devido à terapia utilizada para o tratamento da própria doença, favorecendo a ação de agentes oportunistas¹⁴⁶.

As infecções virais mais comuns em pacientes imunodeprimidos são aquelas causadas pelos herpesvírus humanos, principalmente o citomegalovírus, que sai do seu estado de latência e pode causar doença se o vírus replicar, o que chamamos de infecção ativa^{147; 148}.

Outros agentes, virais e não virais, podem acometer pacientes imunodeprimidos e veem sendo relacionados em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico^{149; 150}. Estas apresentações são menos comuns porém não menos importantes ou graves quanto as manifestações apresentadas pelas infecções por herpesvírus^{150; 151; 152}.

Vírus do grupo herpes, tais como o Epstein-Barr, CMV, bem como os herpesvírus 6 e 7, podem também se reativar, aproveitando a fragilidade imune dos pacientes lúpicos. Neste estudo, o objetivo principal foi verificar se estes herpesvírus estão presentes nos pacientes com LES. Para tanto, foram incluídos pacientes com LES comprovado, doença em atividade ou não, sendo também verificado o impacto clínico causado pela infecção ativa nestes pacientes. As publicações a este respeito são escassas na literatura e assim firmamos a importância deste estudo para aumentar nosso conhecimento a respeito da correlação LES e infecção herpética.

A utilização de marcadores de infecção ativa causada pelos herpesvírus, tais como a antigenemia para CMV e a Nested-PCR são ferramentas úteis para identificar pacientes com infecção ativa. Estes indicadores são importantes para selecionar pacientes com um risco aumentado de evoluir para doença viral^{153; 154; 155}.

Dos poucos estudos existentes na literatura, os principais foram aqueles relacionando infecções virais em pacientes lúpicos¹⁵⁶. Quando relacionados os

herpesvírus, a principal interação estudada é a do EBV com Lúpus Eritematoso Sistêmico. No trabalho de James, 2012, é citado que pacientes lúpicos possuem uma resposta imunológica desregulada contra o EBV. Também é sugerido um provável mimetismo molecular entre os antígenos do EBV e os produzidos no Lúpus Eritematoso Sistêmico aliado a uma maior soroconversão para EBV o que sugere uma maior reativação viral em pacientes com LES¹⁵⁷.

Este mimetismo molecular entre os antígenos do EBV e aos apresentados em pacientes lúpicos também é discutido em diversos trabalhos onde é citada uma possível modulação do sistema imune pelo EBV o que ocasionaria uma elevação da resposta autoimune^{54; 158; 159; 160; 161}.

Neste trabalho não observamos nenhuma positividade para o vírus Epstein-Barr, fato também demonstrado no estudo de Kosminsky (*Kosminsky, de Menezes et al. 2006*).

Estudos recentes têm sugerido que a associação entre o HHV-7 e CMV pode elevar o nível de imunodepressão possivelmente devido a uma potencialização do efeito do CMV ou modulação do sistema imune^{146; 162}. Esta imunomodulação pode predispor a outras infecções oportunistas como invasão fúngica^{163; 164; 165}.

Com relação aos CMV, neste trabalho, observamos que a infecção ativa ocorreu em 6 dos 10 (60%) pacientes que apresentaram infecção ativa pelos herpesvírus estudados, sendo que destes, 5 pacientes apresentavam lúpus em atividade.

Em crianças portadoras de Lúpus Eritematoso Sistêmico Changpin *et al*, 2001 encontrou uma positividade de 28,6% (6/21) para CMV apresentando também que a infecção pode ocorrer antes da terapia imunossupressiva mas apresenta-se mais comumente após a terapia¹⁶⁶.

O HHV-7 parece estar mais associado a transplantes de órgãos sólidos. A coinfeção entre o HHV-7 e Citomegalovírus Humano (CMV) e a modulação imune são os mais importantes fatores no potencial patogênico deste vírus.

Neste trabalho, o DNA do HHV-7 foi detectado em 6 pacientes, sendo que em 5 deles, o lúpus estava em atividade. O outro paciente, com lúpus não ativo, teve infecção

ativa pelo HHV-7, mas também apresentou infecção ativa pelo CMV. Neste paciente não foi observado sintomas relacionado a estas infecções.

Nosso principal achado neste trabalho foi que em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico com a doença em atividade, existe um fator de risco aumentado para o desenvolvimento de infecção ativa e doença causada principalmente pelo CMV.

Estudos futuros deverão ser realizados, principalmente em pacientes com LES com SLEDAI igual ou superior a 8 (lúpus em atividade) através de coletas de sangue mensais para a realização de uma protocolo de monitorização de detecção laboratorial de infecção ativa viral.

7 CONCLUSÃO

- Verificou-se a presença do DNA e do antígeno *pp65* do CMV nas amostras de sangue obtidas dos pacientes estudados com a utilização das técnicas de Nested-PCR e antigenemia propostas no trabalho;
- Verificou-se, a presença de DNA do Herpesvírus Humano 7 através da técnica de Nested-PCR nas amostras de sangue dos pacientes estudados;
- Não obtivemos a detecção do DNA do EBV e HHV-6;
- Avaliamos o impacto clínico causado por estas infecções nos pacientes com LES ressaltando um maior fator de risco para o desenvolvimento de infecção ativa por herpesvírus em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico em atividade, SLEDAI ≥ 8 .

8 APOIO

Meus sinceros agradecimentos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo suporte financeiro deste trabalho.

9 Referências Bibliográficas

- ¹ SMITH, C. D.; CYR, M. The history of lupus erythematosus. From Hippocrates to Osler. **Rheum Dis Clin North Am**, v. 14, n. 1, p. 1-14, Apr 1988.
- ² MALLAVARAPU, R. K.; GRIMSLEY, E. W. The history of lupus erythematosus. **South Med J**, v. 100, n. 9, p. 896-8, Sep 2007.
- ³ HARGRAVES, M. M. Discovery of the LE cell and its morphology. **Mayo Clin Proc**, v. 44, n. 9, p. 579-99, Sep 1969.
- ⁴ FRIIOU, G. J. Antinuclear antibodies: diagnostic significance and methods. **Arthritis Rheum**, v. 10, n. 2, p. 151-9, Apr 1967.
- ⁵ SATO, E. I., BONFÁ, E. D., CONSTALLAT, L. T. L., *ET AL.* Lúpus Eritematoso Sistêmico: Tratamento do Acometimento Cutâneo/Articular. **Projeto Diretrizes: Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina**, 2004.
- ⁶ KLIPPEL, J., DIEPPE, P. **Rheumatology**. 2nd. London: Mosby, 1998.
- ⁷ KANG, I., QUAN, T., NOLASCO, H., *ET AL.* Defective Control of Latent Epstein-Barr Virus Infection in Systemic Lupus Erythematosus. The Journal of Immunology. 172: 1287-1294 p. 2004.
- ⁸ COSTA, S. C. B., MIRANDA, S. R. P., ROSSI, *ET AL.* Donated Organs as a Source of Cytomegalovirus (CMV) in Renal Transplant Patients. Bras. J. Med. Biol. Res. 27: 2573-2578 p. 1994.
- ⁹ SEGAL, B. H.; SNELLER, M. C. Infectious complications of immunosuppressive therapy in patients with rheumatic diseases. **Rheum Dis Clin North Am**, v. 23, n. 2, p. 219-37, May 1997.

- ¹⁰ MARINI, R.; COSTALLAT, L. T. Young age at onset, renal involvement, and arterial hypertension are of adverse prognostic significance in juvenile systemic lupus erythematosus. **Rev Rhum Engl Ed**, v. 66, n. 6, p. 303-9, Jun 1999.
- ¹¹ RAHMAN, P.; GLADMAN, D. D.; UROWITZ, M. B. Clinical predictors of fetal outcome in systemic lupus erythematosus. **J Rheumatol**, v. 25, n. 8, p. 1526-30, Aug 1998.
- ¹² EROGLU, G. E.; KOHLER, P. F. Familial systemic lupus erythematosus: the role of genetic and environmental factors. **Ann Rheum Dis**, v. 61, n. 1, p. 29-31, Jan 2002.
- ¹³ WALLACE, D. J.; LINKER-ISRAELI, M. It's not the same old lupus or Sjogren's any more: one hundred new insights, approaches, and options since 1990. **Curr Opin Rheumatol**, v. 11, n. 5, p. 321-9, Sep 1999.
- ¹⁴ KATZ, J. D. et al. A simple severity of disease index for systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 2, n. 2, p. 119-23, Apr 1993.
- ¹⁵ PAWLAK, C. R. et al. Patients with systemic lupus erythematosus differ from healthy controls in their immunological response to acute psychological stress. **Brain Behav Immun**, v. 13, n. 4, p. 287-302, Dec 1999.
- ¹⁶ UTHMAN, I. et al. Systemic lupus erythematosus in Lebanon. **Lupus**, v. 8, n. 9, p. 713-5, 1999.
- ¹⁷ BARZILAI, O. et al. Epstein-Barr virus and cytomegalovirus in autoimmune diseases: are they truly notorious? A preliminary report. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1108, p. 567-77, Jun 2007.
- ¹⁸ DUBOIS, E. L.; TUFFANELLI, D. L. Clinical Manifestations of Systemic Lupus Erythematosus. Computer Analysis of 520 Cases. **JAMA**, v. 190, p. 104-11, Oct 12 1964.
- ¹⁹ SIEGEL, M.; LEE, S. L. The epidemiology of systemic lupus erythematosus. **Semin Arthritis Rheum**, v. 3, n. 1, p. 1-54, 1973.

- 20 PETRI, M. Epidemiology of systemic lupus erythematosus. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 16, n. 5, p. 847-58, Dec 2002.
- 21 HOPKINSON, N. D.; DOHERTY, M.; POWELL, R. J. Clinical features and race-specific incidence/prevalence rates of systemic lupus erythematosus in a geographically complete cohort of patients. **Ann Rheum Dis**, v. 53, n. 10, p. 675-80, Oct 1994.
- 22 JOHNSON, A. E. et al. The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Birmingham, England. Relationship to ethnicity and country of birth. **Arthritis Rheum**, v. 38, n. 4, p. 551-8, Apr 1995.
- 23 ALARCON, G. S. et al. Effect of hydroxychloroquine on the survival of patients with systemic lupus erythematosus: data from LUMINA, a multiethnic US cohort (LUMINA L). **Ann Rheum Dis**, v. 66, n. 9, p. 1168-72, Sep 2007.
- 24 O'NEILL, S.; CERVERA, R. Systemic lupus erythematosus. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 24, n. 6, p. 841-55, Dec 2010.
- 25 CHAHADE, W. H. et al. Systemic lupus erythematosus in Sao Paulo/Brazil: a clinical and laboratory overview. **Lupus**, v. 4, n. 2, p. 100-3, Apr 1995.
- 26 BITTENCOURT, R., FLOGLIATO, L., DAUDT, L., ET AL. Leucemia Mielóide Aguda: Perfil de Duas Décadas do Serviço de Hematologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - RS. **Rev. Bras. Hematol. Hemote.**, v. 25, n. 1, 2003.
- 27 BOMBARDIER, C. et al. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. **Arthritis Rheum**, v. 35, n. 6, p. 630-40, Jun 1992.
- 28 SANTOS, D. D., PERCEGONA, L., OLIVEIRA, M. E., ET AL.. Lupus Eritematoso Sistêmico e Infecção por CMV: Descrição de casos. **Ver. Bras. Reumatol.**, v. 38-no5, Set/Out 1998.

- 29 ZHANG, C. S., K.; JIANG, Z.; *ET AL.* **Early Diagnosis And Monitoring of Active HCMV Infection in Children With Systemic Lupus Erythematosus.** Chinese Medical Journal. 114(12): 1309-1312 p. 2001.
- 30 COSTA, S. C. B., MIRANDA, S. R. P., ALVES, G., *ET AL.* **Detection of Cytomegalovirus Infection by PCR in Renal Transplant Patients.** Bras. J. Med. Biol. Res. 32: 953-959 p. 1999.
- 31 BONON, S. H. et al. Comparison of serology, antigenemia assay and the polymerase chain reaction for monitoring active cytomegalovirus infections in hematopoietic stem cell transplantation patients. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 48, n. 5, p. 275-8, Sep-Oct 2006.
- 32 KATAGIRI, A. A., T.; KON, T. Cavitory Lung Lesion in a Patient With Lupus Erythematosus: An Unusual Manifestation of Cytomegalovirus Pneumonitis. **Mod. Rheumatology.**, 2008.
- 33 TANAKA, Y. et al. Systemic lupus erythematosus complicated by cytomegalovirus-induced hemophagocytic syndrome and pneumonia. **Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi**, v. 31, n. 1, p. 71-5, Feb 2008.
- 34 RAMOS-CASALS, M. et al. Acute viral infections in patients with systemic lupus erythematosus: description of 23 cases and review of the literature. **Medicine (Baltimore)**, v. 87, n. 6, p. 311-8, Nov 2008.
- 35 FERREIRA, W., SOUSA, J. **Microbiologia**. Lisboa: Lidel - Edições Técnicas, 2002.
- 36 WAGNER, E., HEWLETT, M. **Basic Virology**. Black Science. USA: Inc 1999.
- 37 MADIGAN, M., MARTINKO, J., PARKER, J. **Brok - Biology of Microorganisms**. 9th. New Jersey, USA: Prentice Hall, 2000.
- 38 ZUR HAUSEN, H. et al. EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. **Nature**, v. 228, n. 5276, p. 1056-8, Dec 12 1970.

- 39 ZIEGLER, J. L. et al. Outbreak of Burkitt's-like lymphoma in homosexual men. **Lancet**, v. 2, n. 8299, p. 631-3, Sep 18 1982.
- 40 WEISS, L. M. et al. Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. **N Engl J Med**, v. 320, n. 8, p. 502-6, Feb 23 1989.
- 41 JONES, J. F. et al. T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA in patients with chronic Epstein-Barr virus infections. **N Engl J Med**, v. 318, n. 12, p. 733-41, Mar 24 1988.
- 42 NIEDOBITEK, G. The Epstein-Barr virus: a group 1 carcinogen? **Virchows Arch**, v. 435, n. 2, p. 79-86, Aug 1999.
- 43 EVANS, A. S. Clinical syndromes associated with EB virus infection. **Adv Intern Med**, v. 18, p. 77-93, 1972.
- 44 KAFUKO, G. W. et al. Epstein-Barr virus antibody levels in children from the West Nile District of Uganda. Report of a field study. **Lancet**, v. 1, n. 7753, p. 706-9, Apr 1 1972.
- 45 CRAWFORD, D. H. Biology and disease associations of Epstein-Barr virus. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 356, n. 1408, p. 461-73, Apr 29 2001.
- 46 COHEN, J. I. Epstein-Barr virus infection. **N Engl J Med**, v. 343, n. 7, p. 481-92, Aug 17 2000.
- 47 SILVA, A. R., ZUCOLOTO, S. **O Papel do vírus Epstein-Barr na Tumorigênese Humana**. Medicina. Ribeirão Preto. 36: 16-23 p. 2003.
- 48 LEIGHT, E. R.; SUGDEN, B. EBNA-1: a protein pivotal to latent infection by Epstein-Barr virus. **Rev Med Virol**, v. 10, n. 2, p. 83-100, Mar-Apr 2000.
- 49 CARVALHO, R. P. et al. EBV infections in brazil. III -- Infections mononucleosis. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 23, n. 4, p. 167-72, Jul-Aug 1981.
- 50 EVANS, T. J.; BROOKS, L.; FARRELL, P. J. A strategy for specific targeting of therapeutic agents to tumour cells of virus-associated cancers. **Gene Ther**, v. 4, n. 3, p. 264-7, Mar 1997.

- 51 RICKINSON, A. B.; LEE, S. P.; STEVEN, N. M. Cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus. **Curr Opin Immunol**, v. 8, n. 4, p. 492-7, Aug 1996.
- 52 EVANS, A. S. E.B. virus antibody in systemic lupus erythematosus. **Lancet**, v. 1, n. 7707, p. 1023-4, May 15 1971.
- 53 POOLE, B. D. et al. Epstein-Barr virus and molecular mimicry in systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity**, v. 39, n. 1, p. 63-70, Feb 2006.
- 54 HARLEY, J. B. et al. The curiously suspicious: a role for Epstein-Barr virus in lupus. **Lupus**, v. 15, n. 11, p. 768-77, 2006.
- 55 COSTENBADER, K. H.; KARLSON, E. W. Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis: is there a link? **Arthritis Res Ther**, v. 8, n. 1, p. 204, 2006.
- 56 LEVIN, L. I. et al. Multiple sclerosis and Epstein-Barr virus. **JAMA**, v. 289, n. 12, p. 1533-6, Mar 26 2003.
- 57 HAAHR, S.; HOLLSBERG, P. Multiple sclerosis is linked to Epstein-Barr virus infection. **Rev Med Virol**, v. 16, n. 5, p. 297-310, Sep-Oct 2006.
- 58 PADALKO, E. Y.; BOSSUYT, X. Anti-dsDNA antibodies associated with acute EBV infection in Sjogren's syndrome. **Ann Rheum Dis**, v. 60, n. 10, p. 992, Oct 2001.
- 59 TRIMECHE, M. et al. [Prevalence of Epstein-Barr virus in Sjogren's syndrome in Tunisia]. **Rev Med Interne**, v. 27, n. 7, p. 519-23, Jul 2006.
- 60 VRBIKOVA, J. et al. Epstein-Barr virus serology in patients with autoimmune thyroiditis. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v. 104, n. 1, p. 89-92, 1996.
- 61 VENTO, S. et al. Epstein-Barr virus as a trigger for autoimmune hepatitis in susceptible individuals. **Lancet**, v. 346, n. 8975, p. 608-9, Sep 2 1995.
- 62 CUOMO, L. et al. Human herpesvirus 6 variant A, but not variant B, infects EBV-positive B lymphoid cells, activating the latent EBV genome through a BZLF-1-dependent mechanism. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 11, n. 10, p. 1241-5, Oct 1995.

- 63 VAUGHAN, J. H. The Epstein-Barr virus and systemic lupus erythematosus. **J Clin Invest**, v. 100, n. 12, p. 2939-40, Dec 15 1997.
- 64 RIBBERT, H. Veber Protozoenartige Zellen in der Niere Einaes Syphilitischen Negeborenen und in der Parotis von Kindern. **Zentralbl All Pathol**, n. 15, p. 945-948, 1904.
- 65 GOODPASTURE, E. W.; TALBOR, F. B. Concering the nature of iportozoan-like cells in certain lesions of infancy. **Am J Dis Child**, n. 21, p. 415-425, 1921.
- 66 SMITH, M. G. Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 92, n. 2, p. 424-30, Jun 1956.
- 67 ROWE, W. P. et al. Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 92, n. 2, p. 418-24, Jun 1956.
- 68 CRAIG, J. M. et al. Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 94, n. 1, p. 4-12, Jan 1957.
- 69 COSTA, S. C. B. **Infecção por Citomegalovírus (CMV): Epidemiologia, Diagnóstico e Tratamento.** Rev. Bras. Clin. Ter. 25(1): 18-28 p. 1999.
- 70 RILEY, H. D., JR. History of the cytomegalovirus. **South Med J**, v. 90, n. 2, p. 184-90, Feb 1997.
- 71 COSTA, F. A. et al. Simultaneous monitoring of CMV and human herpesvirus 6 infections and diseases in liver transplant patients: one-year follow-up. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 66, n. 6, p. 949-53, 2011.
- 72 MILAN, A. et al. Monitoring and detection of cytomegalovirus in liver transplant recipients. **Transplant Proc**, v. 43, n. 4, p. 1360-1, May 2011.
- 73 SMITH, K. O.; RASMUSSEN, L. Morphology of Cytomegalovirus (Salivary Gland Virus). **J Bacteriol**, v. 85, p. 1319-25, Jun 1963.

- 74 WRIGHT, H. T., JR.; GOODHEART, C. R.; LIELAUSIS, A. Human Cytomegalovirus. Morphology by Negative Staining. **Virology**, v. 23, p. 419-24, Jul 1964.
- 75 PANNUTI, C. S. **Infecção por Citomegalovírus**. Rev. Ens. Ped. São Paulo. 6: 144-153 p. 1984.
- 76 HARDY, A. M. et al. The incidence rate of acquired immunodeficiency syndrome in selected populations. **JAMA**, v. 253, n. 2, p. 215-20, Jan 11 1985.
- 77 NICHOLS, W. G., BOECKH, M. **Recent Advances in Therapy and Prevention of CMV Infections**. J. Clin. Virol. 16: 25-40 p. 2000.
- 78 VERONESI, R. E. A. **Citomegalia**. Doenças Infeciosas e Parasitárias: 206-211 p. 1991.
- 79 RUBIN, R. H. **Introduction to the Symposium**. Review of Infectious Diseases. 12(Suppl.): 691-692 p. 1990.
- 80 EPPS, R. E., PITTELKOW, M. R., SU, D. W. P. **TORCH Syndrome**. Semin. Dermatol. 14: 179-186 p. 1995.
- 81 VILMER, C., PÉROL, Y. **Manifestations cutanées des infections cytomegalovirus**. Ann. Dermatol. Vénéréol. 111: 119-125 p. 1984.
- 82 TEGTMEIER, G. E. **Posttransfusion Cytomegalovirus Infections**. Arch. Pathol. Lab. Med. 113: 236-245 p. 1989.
- 83 DRAGO, F., ARAGONE, M. G., LUGANI, C. REBORA, A. **Cytomegalovirus Infection in Normal and Immunocompromised Humans**. Dermatology. 200: 189-195 p. 2000.
- 84 LESHER, J. L., JR. Cytomegalovirus infections and the skin. **J Am Acad Dermatol**, v. 18, n. 6, p. 1333-8, Jun 1988.
- 85 BORGES, L. H. et al. Effect of highly active antiretroviral therapy on cytomegalovirus antigenaemia in AIDS patients. **Int J STD AIDS**, v. 12, n. 4, p. 234-8, Apr 2001.

- 86 AYACHE, D. C. G., COSTA, I. P. Alterações da Personalidade no Lúpus Eritematos Sistêmico. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 45, n. 5, Set/Oct 2005.
- 87 YODA, Y., HANAOKA, R., IDE, H., *ET AL.* **Clinical Evaluation of Patients Inflammatory Connective Tissue Diseases Complicated by Cytomegalovirus Antigenemia.** Mod. Rheumatology. 16: 137-142 p. 2006.
- 88 DENMAN, A. M. Systemic lupus erythematosus--is a viral aetiology a credible hypothesis? **J Infect**, v. 40, n. 3, p. 229-33, May 2000.
- 89 KASAPCOPUR, O. E., Y.; KUTLUG, S.; *ET AL.* . **Systemic Lupus Erythematosus duo to Epstein-Barr virus or Epstein-Barr virus Infection Provocating Acute Exacerbation of Systemic Lupus Erythematosus?** Rheumatol. Int. 26: 765-767 p. 2006.
- 90 SEKIGAWA, I. N., M.; SETA, N.; *ET AL.* Cytomegalovirus Infection in Patients With Systemic Lupus Erythematosus. **Clin. Exp. Rheumatol.**, v. 20, p. 559-564, 2002.
- 91 VASQUEZ, V.; BARZAGA, R. A.; CUNHA, B. A. Cytomegalovirus-induced flare of systemic lupus erythematosus. **Heart Lung**, v. 21, n. 4, p. 407-8, Jul-Aug 1992.
- 92 DUBOIS, E. L., WALLACE, D. L., . Clinical and Laboratory Manifestations of Systemic Lupus Erythematosus. In: DUBOIS, E. L., WALLACE, D. L. (Ed.). **Lupus Erythematosus**. 3rd. Philadelphia: Lea & Febiger, 1987. p.317-449.
- 93 CANNAVAN, F. P. et al. False positive IgM antibody tests for human cytomegalovirus (HCMV) in patients with SLE. **Lupus**, v. 7, n. 1, p. 61-2, 1998.
- 94 RAVEL, R. Infecções Virais - CMV. In: RAVEL, R. (Ed.). **Laboratório Clínico**. 6^a: Guanabara Koogan, 1995.
- 95 YAMANISHI, K.; OKUNO, T. [New human herpesvirus, human herpes virus-6]. **Nihon Rinsho**, v. 47, n. 2, p. 285-9, Feb 1989.
- 96 SALAHUDDIN, S. Z. et al. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. **Science**, v. 234, n. 4776, p. 596-601, Oct 31 1986.

- 97 JOSEPHS, S. F. et al. Genomic analysis of the human B-lymphotropic virus (HBLV). **Science**, v. 234, n. 4776, p. 601-3, Oct 31 1986.
- 98 TAKAHASHI, K. et al. Predominant CD4 T-lymphocyte tropism of human herpesvirus 6-related virus. **J Virol**, v. 63, n. 7, p. 3161-3, Jul 1989.
- 99 ABLASHI, D. V. et al. HBLV (or HHV-6) in human cell lines. **Nature**, v. 329, n. 6136, p. 207, Sep 17-23 1987.
- 100 YAMANISHI, K. et al. Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. **Lancet**, v. 1, n. 8594, p. 1065-7, May 14 1988.
- 101 LEVY, J. A. et al. Frequent isolation of HHV-6 from saliva and high seroprevalence of the virus in the population. **Lancet**, v. 335, n. 8697, p. 1047-50, May 5 1990.
- 102 ABLASHI, D. V. et al. Utilization of human hematopoietic cell lines for the propagation and characterization of HBLV (human herpesvirus 6). **Int J Cancer**, v. 42, n. 5, p. 787-91, Nov 15 1988.
- 103 KATSAFANAS, G. C. et al. In vitro activation of human herpesviruses 6 and 7 from latency. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 18, p. 9788-92, Sep 3 1996.
- 104 STINSKI, M. F. Cytomegalovirus and Its Replication. In: (Ed.). **Virology**. New York: Raven Press Ltda, v.2^a ed., 1990. p.1959-1980.
- 105 BRAUN, D. K.; DOMINGUEZ, G.; PELLETT, P. E. Human herpesvirus 6. **Clin Microbiol Rev**, v. 10, n. 3, p. 521-67, Jul 1997.
- 106 SANTOS, R. L. B. Propriedades Gerais dos Herpesvírus. In: LUPI, A., SILVA, A. S., PEREIRA JR, A. C. (Ed.). **Herpes Clínica, Diagnóstico e Tratamento**: Editora Médica e Científica Ltda, 2000. cap. 10, p.179-189.
- 107 SINGH, N.; CARRIGAN, D. R. Human herpesvirus-6 in transplantation: an emerging pathogen. **Ann Intern Med**, v. 124, n. 12, p. 1065-71, Jun 15 1996.
- 108 FLAMAND, L. et al. Immunosuppressive effect of human herpesvirus 6 on T-cell functions: suppression of interleukin-2 synthesis and cell proliferation. **Blood**, v. 85, n. 5, p. 1263-71, Mar 1 1995.

- 109 RAZONABLE, R. R. et al. Selective reactivation of human herpesvirus 6 variant a occurs in critically ill immunocompetent hosts. **J Infect Dis**, v. 185, n. 1, p. 110-3, Jan 1 2002.
- 110 HARMA, M.; HOCKERSTEDT, K.; LAUTENSCHLAGER, I. Human herpesvirus-6 and acute liver failure. **Transplantation**, v. 76, n. 3, p. 536-9, Aug 15 2003.
- 111 DESACHY, A. et al. Reactivation of human herpesvirus type 6 in multiple organ failure syndrome. **Clin Infect Dis**, v. 32, n. 2, p. 197-203, Jan 15 2001.
- 112 ASHSHI, A. M.; KLAPPER, P. E.; COOPER, R. J. Detection of human cytomegalovirus, human herpesvirus type 6 and human herpesvirus type 7 in urine specimens by multiplex PCR. **J Infect**, v. 47, n. 1, p. 59-64, Jul 2003.
- 113 HUMAR, A. et al. Clinical impact of human herpesvirus 6 infection after liver transplantation. **Transplantation**, v. 73, n. 4, p. 599-604, Feb 27 2002.
- 114 SINGH, N. et al. Impact of human herpesvirus-6 on the frequency and severity of recurrent hepatitis C virus hepatitis in liver transplant recipients. **Clin Transplant**, v. 16, n. 2, p. 92-6, Apr 2002.
- 115 GUIDELINES, A. S. O. T. I. D. **Other Herpesvirus: HHV-6, HHV-7, HHV-8, HSV-1 and -2, VZV**: Am. J. Transplant. (4 Suppl 10): 66-71 p. 2004.
- 116 SEISHIMA, M. et al. Reactivation of human herpesvirus (HHV) family members other than HHV-6 in drug-induced hypersensitivity syndrome. **Br J Dermatol**, v. 155, n. 2, p. 344-9, Aug 2006.
- 117 LALANI, A. S.; BARRETT, J. W.; MCFADDEN, G. Modulating chemokines: more lessons from viruses. **Immunol Today**, v. 21, n. 2, p. 100-6, Feb 2000.
- 118 FRENKEL, N. et al. Isolation of a new herpesvirus from human CD4+ T cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 2, p. 748-52, Jan 1990.
- 119 BERNEMAN, Z. N. et al. Human herpesvirus 7 (HHV-7) strain J1: independent confirmation of HHV-7. **J Infect Dis**, v. 166, n. 3, p. 690-1, Sep 1992.

- 120 WARD, K. N. The natural history and laboratory diagnosis of human herpesviruses-6 and -7 infections in the immunocompetent. **J Clin Virol**, v. 32, n. 3, p. 183-93, Mar 2005.
- 121 DEWHURST, S.; SKRINCOSKY, D.; VAN LOON, N. Human herpesvirus 7. **Expert Rev Mol Med**, v. 1997, p. 1-10, Nov 18 1997.
- 122 ABLASHI, D. V. et al. Propagation and characterization of human herpesvirus-7 (HHV-7) isolates in a continuous T-lymphoblastoid cell line (SupT1). **J Virol Methods**, v. 73, n. 2, p. 123-40, Aug 1998.
- 123 MENDEZ, J. C. et al. Human beta-herpesvirus interactions in solid organ transplant recipients. **J Infect Dis**, v. 183, n. 2, p. 179-184, Jan 15 2001.
- 124 OLIVEIRA, S. A. et al. Primary human herpesvirus-6 and -7 infections, often coinciding, misdiagnosed as measles in children from a tropical region of Brazil. **Epidemiol Infect**, v. 131, n. 2, p. 873-9, Oct 2003.
- 125 TAKAHASHI, Y. et al. Transmission of human herpesvirus 7 through multigenerational families in the same household. **Pediatr Infect Dis J**, v. 16, n. 10, p. 975-8, Oct 1997.
- 126 BLACK, J. B.; PELLETT, P. E. Human herpesvirus 7. **Rev Med Virol**, v. 9, n. 4, p. 245-62, Oct-Dec 1999.
- 127 LJUNGMAN, P. Prevention and treatment of viral infections in stem cell transplant recipients. **Br J Haematol**, v. 118, n. 1, p. 44-57, Jul 2002.
- 128 LAUTENSCHLAGER, I. et al. CMV infection is usually associated with concurrent HHV-6 and HHV-7 antigenemia in liver transplant patients. **J Clin Virol**, v. 25 Suppl 2, p. S57-61, Aug 2002.
- 129 GRIFFITHS, P. D.; CLARK, D. A.; EMERY, V. C. Betaherpesviruses in transplant recipients. **J Antimicrob Chemother**, v. 45 Suppl T3, p. 29-34, Apr 2000.

- 130 PEIGO, M. F. et al. Human herpesvirus-7 in Brazilian liver transplant recipients: a follow-up comparison between molecular and immunological assays. **Transpl Infect Dis**, v. 11, n. 6, p. 497-502, Dec 2009.
- 131 IHIRA, M. et al. Correlation between human herpesvirus 6 and 7 infections after living related liver transplantation. **Microbiol Immunol**, v. 45, n. 3, p. 225-32, 2001.
- 132 FELDSTEIN, A. E. et al. Prevalence and clinical significance of human herpesviruses 6 and 7 active infection in pediatric liver transplant patients. **Pediatr Transplant**, v. 7, n. 2, p. 125-9, Apr 2003.
- 133 REPORT, C. C. D. **Expert Working Group on HHV-6 and 7 Laboratory Diagnosis and Testing**. 2000
- 134 HALL, C. B. et al. Human herpesvirus-6 infection in children. A prospective study of complications and reactivation. **N Engl J Med**, v. 331, n. 7, p. 432-8, Aug 18 1994.
- 135 CASERTA, M. T. et al. Primary human herpesvirus 7 infection: a comparison of human herpesvirus 7 and human herpesvirus 6 infections in children. **J Pediatr**, v. 133, n. 3, p. 386-9, Sep 1998.
- 136 VAN DER BIJ, W. et al. Rapid immunodiagnosis of active cytomegalovirus infection by monoclonal antibody staining of blood leucocytes. **J Med Virol**, v. 25, n. 2, p. 179-88, Jun 1988.
- 137 VAN DER BIJ, W. et al. Cytomegalovirus (CMV) antigenemia: rapid diagnosis and relationship with CMV-associated clinical syndromes in renal allograft recipients. **Transplant Proc**, v. 21, n. 1 Pt 2, p. 2061-4, Feb 1989.
- 138 BOECKH, M., BOWDEN, R. A., GOOSRICH, J. M., *ET AL.*,. **Cytomegalovirus Antigen Detection in Peripheral Blood Leukocytes After Allogeneic Marrow Transplantation**. Blood. 80(5): 1358-1364 p. 1992.
- 139 BONON, S. H. et al. Surveillance of cytomegalovirus infection in haematopoietic stem cell transplantation patients. **J Infect**, v. 50, n. 2, p. 130-7, Feb 2005.

- 140 SAMBROOK, J., E.F. FRITISCH, AND T. MANIATS, . *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* v. 2nd ed. , 1989.
- 141 SHIBATA, D. et al. Detection of cytomegalovirus DNA in peripheral blood of patients infected with human immunodeficiency virus. **J Infect Dis**, v. 158, n. 6, p. 1185-92, Dec 1988.
- 142 SECHIERO, P., CARRIGAN, D. R., ASANO, Y., *ET AL.* **Detection of Human Herpesvirus 6 in Plasma of Chuldren With Primary Infection and Immunosupressed Patients by Polymerase Chain Reaction.** J. Infec. Dis. 171: 273-80 p. 1995.
- 143 POZO, F., TENORIO, A. Detection and typing of lymphotropic herpesviruses by multiplex polymerase chain reaction. **J Virol Methods**, v. 79, n. 1, p. 9-19, Apr 1999.
- 144 SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F., *ET AL.* Enzymatic Amplification of Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analyses for Diagnosis of Sickle-Cell Anemia. **Science**, p. 230, 1990.
- 145 THOMASINI, R. L. et al. Detection and monitoring of human herpesvirus 7 in adult liver transplant patients: impact on clinical course and association with cytomegalovirus. **Transplant Proc**, v. 39, n. 5, p. 1537-9, Jun 2007.
- 146 CUNHA, B. A.; GOUZHVA, O.; NAUSHEEN, S. Severe cytomegalovirus (CMV) community-acquired pneumonia (CAP) precipitating a systemic lupus erythematosus (SLE) flare. **Heart Lung**, v. 38, n. 3, p. 249-52, May-Jun 2009.
- 147 COSTA, F. A. **DETECÇÃO E MONITORIZAÇÃO DO HERPESVÍRUS HUMANO TIPO 6 (HHV-6) E DO CITOMEGALOVÍRUS HUMANO (HCMV) EM PACIENTES TRANSPLANTADOS HEPÁTICOS.** 2005. 54-55 Mestrado Clínica Médica, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas.
- 148 DE CAMPOS DIEAMANT, D. et al. Active human cytomegalovirus infection and glycoprotein b genotypes in brazilian pediatric renal or hematopoietic stem cell transplantation patients. **Braz J Microbiol**, v. 41, n. 1, p. 50-8, Jan 2010.

- 149 COSTAPINTO, L. et al. Prevalence of Chlamydia trachomatis endocervical infection in systemic lupus erythematosus patients and evaluation of the risk for HPV-induced lesions. **Rheumatol Int**, v. 33, n. 3, p. 631-6, Mar 2013.
- 150 STAPLES, P. J. et al. Incidence of infection in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v. 17, n. 1, p. 1-10, Jan-Feb 1974.
- 151 CHEN, G. L. et al. Invasive fungal infection in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. **Clin Rheumatol**, v. 31, n. 7, p. 1087-91, Jul 2012.
- 152 WATANABE, R. et al. Prevalence and time course of hepatitis B virus infection in patients with systemic lupus erythematosus under immunosuppressive therapy. **Mod Rheumatol**, v. 23, n. 6, p. 1094-100, Nov 2013.
- 153 VAN DEN BERG, A. P. et al. Antigenemia in the diagnosis and monitoring of active cytomegalovirus infection after liver transplantation. **J Infect Dis**, v. 164, n. 2, p. 265-70, Aug 1991.
- 154 HUMAR, A. et al. The clinical utility of CMV surveillance cultures and antigenemia following bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant**, v. 23, n. 1, p. 45-51, Jan 1999.
- 155 GOOSSENS, V. J. et al. Early detection of cytomegalovirus in renal transplant recipients: comparison of PCR, NASBA, pp65 antigenemia, and viral culture. **Transplant Proc**, v. 32, n. 1, p. 155-8, Feb 2000.
- 156 ZHOU, W. J.; YANG, C. D. The causes and clinical significance of fever in systemic lupus erythematosus: a retrospective study of 487 hospitalised patients. **Lupus**, v. 18, n. 9, p. 807-12, Aug 2009.
- 157 JAMES, J. A.; ROBERTSON, J. M. Lupus and epstein-barr. **Curr Opin Rheumatol**, v. 24, n. 4, p. 383-8, Jul 2012.
- 158 TOUSSIROT, E.; ROUDIER, J. Epstein-Barr virus in autoimmune diseases. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 22, n. 5, p. 883-96, Oct 2008.

- 159 GROSS, A. J. et al. EBV and systemic lupus erythematosus: a new perspective. **J Immunol**, v. 174, n. 11, p. 6599-607, Jun 1 2005.
- 160 POOLE, B. D. et al. Aberrant Epstein-Barr viral infection in systemic lupus erythematosus. **Autoimmun Rev**, v. 8, n. 4, p. 337-42, Feb 2009.
- 161 KOSMINSKY, S.; DE MENEZES, R. C.; COELHO, M. R. [Epstein-Barr virus infection in patients with systemic lupus erythematosus]. **Rev Assoc Med Bras**, v. 52, n. 5, p. 352-5, Sep-Oct 2006.
- 162 TONG, C. Y. et al. Association of human herpesvirus 7 with cytomegalovirus disease in renal transplant recipients. **Transplantation**, v. 70, n. 1, p. 213-6, Jul 15 2000.
- 163 WENG, C. T. et al. A retrospective study of catastrophic invasive fungal infections in patients with systemic lupus erythematosus from southern Taiwan. **Lupus**, v. 19, n. 10, p. 1204-9, Sep 2010.
- 164 RAZONABLE, R. R.; PAYA, C. V. The impact of human herpesvirus-6 and -7 infection on the outcome of liver transplantation. **Liver Transpl**, v. 8, n. 8, p. 651-8, Aug 2002.
- 165 CHAROUDEH, H. N. et al. Modulation of the natural killer cell KIR repertoire by cytomegalovirus infection. **Eur J Immunol**, v. 43, n. 2, p. 480-7, Feb 2013.
- 166 ZHANG, C. et al. Early diagnosis and monitoring of active HCMV infection in children with systemic lupus erythematosus. **Chin Med J (Engl)**, v. 114, n. 12, p. 1309-12, Dec 2001.

10 ANEXO 1

INFECÇÃO ATIVA PELO CITOMEGALOVÍRUS EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

Escalas de Avaliação de Estágio da Doença (LES) - SLEDAI

Peso	Descritor	Definição
8	<i>Convulsão</i>	Início recente (últimos 10 dias). Excluir causas metabólicas infecciosas e por drogas ou convulsão causada por dano no SNC irreversível, ocorrido no passado.
8	Psicose	Habilidade alterada de realizar atividades normais devido a distúrbio sério de percepção da realidade. Incluir alucinações, incoerência, associações nitidamente imprecisas, raciocínio empobrecido, raciocínio nitidamente ilógico, estranho, desorganizado, ou comportamento catatônico. Excluir causas por uremiase drogas.
8	Síndrome cerebral orgânica	Função mental alterada, com orientação e memória prejudicadas ou outra função intelectual comprometida, apresentando início rápido e sintomas clínicos oscilantes. Incluir perturbação da consciência, com redução da capacidade de concentrar e incapacidade para prestar atenção ao ambiente, mas no mínimo 2 dos sintomas: distúrbios de percepção, discurso incoerente, insônia ou sonolência durante o dia, ou aumento ou diminuição da atividade psicomotora. Excluir causas metabólicas, infecciosas ou por drogas.
8	Distúrbio Visual	Alterações do LES na retina e nos olhos. Incluir corpos citóides, hemorragias da retina, secreção serosa de hemorragia na coróide, neurite óptica, esclerite ou episclerite. Excluir hipertensão, infecção ou causas por drogas.
8	Distúrbio nervoso craniano	Novo início de neuropatia sensorial ou motora, envolvendo os nervos cranianos. Incluir vertigem causada pelo Lúpus.
8	Cefaléia do Lúpus	Dor de cabeça forte e persistente: pode ser migrânea, mas não responsiva à analgesia narcótica.
8	AVC	Novo início de AVC(s). Excluir causas por Arteriosclerose ou hipertensão.

8	Vasculite	Ulceração, gangrena, nódulos sensíveis nos dedos, infarto periungual, hemorragias puntiformes(splinter), ou biopsia ou exame de angiografia para vasculite.
4	Artrite	Mais de duas juntas apresentam dor e sinais de inflamação(ou seja, sensibilidade, inchaço ou efusão).
4	Miosite	Dor/Fraqueza do músculo proximal, associados a níveis elevados de creatinina fosfocinase/aldolase, ou alterações de eletromiograma, ou biopsia apresentando miosite
4	Cilindros Urinários	Cilindros hemáticos ou hemegranulares.
4	Hematúria	> que 5 glóbulos vermelhos/campo de alta potência. Excluir cálculos, infecções ou outras causas.
4	Proteinúria	Novo início ou aumento recente de mais de 0,5g/24 Horas.
4	Piúria	> que 5 glóbulos brancos/campo de alta potência. Excluir infecção.
2	Rash Cutâneo	Rash cutâneo do LES recente ou em andamento
2	Alopécia	Perda de cabelo anormal nova ou em andamento,irregular ou difusa, causada por lúpus ativo.
2	Úlceras na mucosa	Úlceras orais ou nasais novas ou em andamento, causadas por lúpus ativo.
2	Pleurisia	Dor torácica pleurítica clássica e séria, ou atrito pleural, ou efusão, ou espessamento pleural devido ao lúpus.
2	Pericardite	Dor pericárdica clássica ou séria, ou atrito, ou efusão, ou confirmação por eletrocardiograma.
2	Complemento Baixo	Diminuição de CH50, C3 ou C4, em níveis abaixo do limite mínimo de normalidade em testes laboratoriais.
2	Ligação de DNA elevada	> que 25% de ligação por meio de ensaio Farr ou intervalo acima do normal em testes laboratoriais.
1	Febre	> que 38º C. Excluir causa infecciosa.
1	Trombocitopenia	< que 100.000 plaquetas/ mm ³
1	Leucopenia	< que 3.000 glóbulos brancos/mm ³ . Excluir causas por drogas.
	PONTUAÇÃO TOTAL	Soma dos pesos indicados ao lado dos descritores marcados

Fonte: adaptado de: Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, et al. Derivação de SLEDAI: um índice de atividades da doença para pacientes com lupus. Comitê de Estudos Prognósticos de LES. *Arthritis Rheum* 1992; 35 (6): 630-640.

11 ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, R.G. _____, aceito colaborar com o estudo **“Infecção ativa por Herpesvírus em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico”**, que será realizado na faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para pesquisa da infecção ativa pelo citomegalovírus utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase e a Antigenemia. Para isso, sei que colherão amostras de sangue no ambulatório ou enfermaria de Reumatologia do HC-UNICAMP, para a realização dos testes diagnósticos. Estou ciente que poderei desistir de participar deste estudo a qualquer hora, e que isto nada irá prejudicar o meu tratamento; e que a minha colaboração em muito auxiliará o tratamento dos pacientes que vierem a apresentar infecção pelos herpesvírus. Estou ciente de que todos os dados colhidos serão sigilosos, e que meu nome não será colocado em qualquer publicação. As amostras serão armazenadas em freezer – 20 ° C, seguindo as normas da resolução Nº 347, como fonte de material biológico para estudos futuros.

Referente ao armazenamento das amostras optarei por uma alternativa se **aceitarei ou não** que minha amostra seja armazenada como fonte de material biológico para possíveis estudos futuros, após aceitação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

() ACEITO

() NÃO ACEITO

Campinas, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Paciente ou Responsável

Pesquisador responsável: Murilo de Freitas Peigo- tel. (19) 3521 7734

E-mail: murilodef Freitas@gmail.com

Orientador (a): Prof^a Dr^a Sandra Cecília Botelho Costa- tel. (19) 3289 2351

E-mail: costa@fcm.unicamp.br

Comitê de Ética em pesquisa- tel. (19) 3521 8936.