

***Cristiane Mudinutti da Silva Norberto***

***Infecção ativa por Citomegalovírus Humano  
(HCMV) em Pacientes com Lúpus Eritematoso  
Sistêmico (LES).***



***Campinas  
Unicamp-FCM***

*Cristiane Mudinutti da Silva Norberto*

***Infecção ativa por Citomegalovírus (HCMV)  
em Pacientes com Lúpus Eritematoso  
Sistêmico (LES).***

*Dissertação de Mestrado apresentada à  
Comissão de Pós-Graduação da Faculdade  
de Ciências Médicas do Departamento de  
Clínica Médica da Universidade Estadual de  
Campinas para obtenção do título de Mestre  
em Clínica Médica na área de Ciências  
Básicas.*

**ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Sandra Cecília Botelho Costa**

**CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Lílian Tereza Lavras Costallat**



**UNICAMP**

**Campinas, 2008.**

*iii*

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

N75i Norberto, Cristiane Mudinutti da Silva  
Infecção ativa por Citomegalovírus (HCMV) em pacientes com  
Lúpus Eritematoso Sistêmico ( LES) / Cristiane Mudinutti da Silva  
Norberto. Campinas, SP : [s.n.], 2008.

Orientadores : Sandra Cecília Botelho Costa, Lílian Tereza Lavras  
Costallat

Dissertação ( Mestrado ) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Citomegalovirus. 2. Lupus eritematoso sistêmico. I. Costa,  
Sandra Cecília Botelho. II. Costallat, Lílian Tereza Lavras. III.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.  
IV. Título.

**Título em inglês : Active HCMV infection (HCMV) in patients with Systemic  
Lupus Erythematosus (SLE)**

**Keywords:** • Cytomegalovirus  
• SLE

**Titulação: Mestre em Clínica Médica**  
**Área de concentração: Ciências Básicas**

**Banca examinadora:**

**Profa. Dra. Sandra Cecilia Botelho Costa**  
**Profa. Dra. Sandra Regina Fernandes**  
**Profa. Dra. Maria Aparecida Barone Teixeira**

**Data da defesa: 27-08-2008**

---

**Banca examinadora da Dissertação de Mestrado**  
Cristiane Mudinutti

---

---



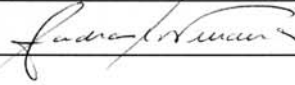
Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sandra Cecilia Botelho Costa

---

---

**Membros:**

---

1. Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sandra Cecilia Botelho Costa 
2. Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Maria Aparecida Barone Teixeira 
3. Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sandra Regina Muchinechi Fernandes 

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

---

Data: 27/08/2008

---

## **DEDICATÓRIA**

*“Aos meus filhos, Augusto e Guilherme, pela paciência, carinho. Pelo meu marido, pela paciência, força, coragem e incentivo e por sempre estarem ao meu lado nos momentos mais difíceis”.*

*“Homenagem à Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa, à Dra. Sandra Helena Alves Bonon e Dra. Lílian Tereza Lavras Costallat pela orientação, pelos ensinamentos e sugestões valiosas, que muito contribuíram para a finalização de um sonho e de mais uma etapa percorrida em minha vida.”*

*Agradeço a Deus pelas oportunidades recebidas em minha vida.*

*A Deus, que com sua sabedoria e bondade infinita tornou-me capaz de ajudar e ser ajudada e sempre iluminando e protegendo-me durante estes anos de dedicação aos estudos.*

*Em especial aos meus filhos, que são meu maior incentivo, pois tudo o que faço hoje é por eles, apesar de todas as dificuldades e obstáculos.*

*Ao meu marido Carlos Henrique pela paciência, compreensão e carinho. E toda a sua família pelo incentivo e apoio moral. (Cidinha, Carlinhos, Daniela, Lucas e Rafael).*

*A Profa. Dra. Ana Laura Remédio Z. Beretta que me iniciou na pesquisa.*

*A todos os meus familiares, meus Pais, irmãos, tios e em especial meus Avós, pela ajuda, incentivo e apoio em todas as horas deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.*

*Aos amigos do laboratório: Débora, Bruna, Daniela, Juliana, Telma, Ronaldo agradeço pela ajuda nas horas de aperto, incentivo e companherismo.*

*À equipe de Médicos e enfermagem da Reumatologia, o que muito contribuíram para a realização deste projeto.*

*Á todos os meus pacientes que aceitaram participar deste estudo.*

*"O começo da sabedoria é encontrado na dúvida; duvidando começamos a questionar, e procurando podemos achar a verdade."*  
*(Pierre Abelard)* *"O conhecimento é o processo de acumular dados; a sabedoria reside na sua simplificação."* *(Martin H. Fischer);*

*"É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar. É melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver".*  
*(Martin Luther king);*

*"A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original."* *(Albert Einstein)*



*Trabalho realizado no Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular e Antigenemia, do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) com a colaboração do serviço de Reumatologia, Hospital das Clínicas-UNICAMP.*

<b>RESUMO.....</b>	xxxix
<b>ABSTRACT.....</b>	xxxv
<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	39
1.1- HISTÓRICO DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO (LES).....	41
1.2- DEFINIÇÃO.....	41
1.3- EPIDEMIOLOGIA.....	42
1.4- ETIOLOGIA.....	43
1.5-CRITÉRIOS PARA DIAGNÓSTICO DO LÚPUS.....	46
1.6-ÍNDICES UTILIZADOS PARA MEDIR A ATIVIDADE DO LES.....	47
1.7-TRATAMENTO DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO.....	48
1.8-INFECÇÕES POR HCMV EM PACIENTES COM LES.....	49
1.9-CITOMEGALOVÍRUS HUMANO.....	51
1.9.1-ESTRUTURA VIRAL.....	51
1.9.2-FISIOPATOLOGIA.....	52
1.9.3-CICLO DE REPLICAÇÃO E REGULAÇÃO GÊNICA.....	53
1.9.4-EPIDEMIOLOGIA E TRANSMISSÃO.....	54
1.9.5-PATOGÊNESE.....	56
1.9.6-MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	57
1.9.7-DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE INFECÇÃO ATIVA PELO HCMV.....	59
1.9.8-DETECÇÃO DO ANTÍGENO <i>pp65</i> DO HCMV EM SANGUE PERIFÉRICO (ANTIGENEMIA).....	59
1.9.9-REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	61
<b>2- OBJETIVOS.....</b>	65
<b>3- CASUÍSTICA.....</b>	69
3.1-CRITÉRIOS PARA INCLUSÃO DOS PACIENTES NO ESTUDO.....	71
3.2-CRITÉRIOS PARA SUSPENSÃO OU ENCERRAMENTO.....	71
3.3- CRITÉRIOS PARA DIAGNÓSTICO DE LES	72
3.4-CRITÉRIOS UTILIZADOS PARA VERIFICAR O ÍNDICE DE ATIVIDADE DA DOENÇA LÚPICA (SLEDAI).....	73
3.5- DE ACORDO COM O SLEDAI, OS PACIENTES FORAM DIVIDIDOS EM DOIS GRUPOS, GRUPO A E GRUPO B	73
3.6-CRITÉRIOS UTILIZADOS PARA DEFINIÇÃO DE INFECÇÃO ATIVA	73

PELO HCMV.....	74
3.4.1-CRITÉRIOS UTILIZADOS PARA DEFINIÇÃO DE DOENÇA POR HCMV.....	74
<b>4- MÉTODOS.....</b>	<b>75</b>
4.1-DETECÇÃO DO ANTÍGENO pp65 DO HCMV EM NEUTRÓFILOS (ANTIGENEMIA).....	75
4.1.1-EXTRAÇÃO DOS LEUCÓCITOS POLIMORFONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO.....	75
4.1.2-PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS.....	76
4.1.3-COLORAÇÃO DAS LÂMINAS.....	77
4.1.4-LEITURA E INTERPRETAÇÃO DAS LÂMINAS.....	77
4.2-REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE TIPO NESTED-PCR.....	78
4.2.1-EXTRAÇÃO DE DNA.....	79
4.2.2-LISE DE LEUCÓCITOS.....	79
4.2.3-AMPLIFICAÇÃO GÊNICA DO HCMV PELA REAÇÃO DA CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	80
4.2.4-INICIADORES (PRIMERS) EXTERNOS.....	80
4.2.5-REAMPLIFICAÇÃO DO GENOMA DO HCMV PELA NESTED-PCR	84
4.2.6-CUIDADOS ESPECIAIS UTILIZADOS PARA SE EVITAR CONTAMINAÇÃO DAS AMOSTRAS DURANTE A REAÇÃO DA PCR.....	85
<b>5-RESULTADOS.....</b>	<b>87</b>
5.1-TOTAL DE EXAMES REALIZADOS DURANTE A MONITORIZAÇÃO.....	87
5.2-CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES INCLUÍDOS NO ESTUDO.....	88
5.3-DESCRIÇÃO DOS PACIENTES EM RELAÇÃO AO SLEDAI.....	90
5.4-INFECÇÃO ATIVA PELO CITOMEGALOVÍRUS (HCMV).....	91
5.5-DESCRIÇÃO DOS PACIENTES QUE APRESENTARAM INFECÇÃO ATIVA PELO HCMV	94
5.6-FATOR DE RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DE INFECÇÃO E DOENÇA POR HCMV.....	95
5.7-CAUSA DE PROVÁVEL DOENÇA POR HCMV.....	95
5.8-CAUSA DOS ÓBITOS OCORRIDOS NOS PACIENTES DURANTE O	96

SEGUIMENTO.....	
<b>6-DISSCUSSÃO.....</b>	<b>97</b>
<b>7-CONCLUSÕES.....</b>	<b>105</b>
<b>8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>109</b>
<b>9-ANEXOS.....</b>	<b>134</b>
9.A-SLEDAI (ÍNDICE DE ATIVIDADE DA DOENÇA LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO).....	135
9.B-TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	137
9.C-CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS PACIENTES ENVOLVIDOS NO ESTUDO.....	138
9.D- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	141

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

---

LES- Lúpus Eritematoso Sistêmico  
EUA- Estados Unidos América  
AC- Anticorpo  
AG- Antígeno  
AVC- Acidente vascular cerebral  
HIV- Vírus da imunodeficiência humana  
SNC- Sistema nervosa central  
ECG- Eletrocardiograma  
Hb- Hemoglobina  
g- gramas  
mm<sup>3</sup>- milímetros cúbicos  
IF-Imunofluorescência  
VHS-Velocidade de hemossedimentação  
PCR- Proteína C-reativa  
FAN-Anticorpo anti nuclear  
Anti-DNA- Anticorpos anti DNA  
ANA-anticorpo antinuclear  
LCR- Líquido Céfaloraquidiano  
SLEDAI-Systemic lupus erythematosus disease activity  
SLAM- Systemic lupus Activity measures  
BILAG- British isles lupus Assessment Group  
LAI- University of California, San Francisco Johns Hopkins University lupus activity index  
AINES- Antiinflamatórios não esteroidais  
HCMV- Citomegalovírus  
AD169- Linhagem de HCMV isolada em laboratório  
HHV-5- Herpes Vírus Humano tipo 5  
DNA- Ácido desoxirribonucléico  
Kb- Kilobases

Pb- Pares de bases

Kpb- Kilo pares de bases

U<sub>L</sub>- Seqüência única longa (“UniqueLong”) do genoma do HCMV

U<sub>S</sub>- Seqüência Única curta (“Unique short”) do genoma do HCMV

IR<sub>L</sub>/IR<sub>S</sub>- Seqüências invertidas repetidas do genoma do HCMV (“inverted Repeats”)

TR<sub>L</sub>/TR<sub>S</sub>- Seqüências de terminações repetidas do genoma do HCMV (“Terminal Repeats”)

IE- Período de expressão gênica “Immediate Early”-imediatamente precoce

E- Período de expressão gênica “Early”- precoce

L- Período de expressão gênica “Late”- tardia

pH- Potencial hidrogeniônico

RNA- Ácido ribonucléico

mRNA- RNA mensageiro

AIDS- Síndrome da imunodeficiência Adquirida

TMO- Transplante de Medula Óssea

IgG- Imunoglobulina da classe G

IgM- Imunoglobulina de classe M

ELISA- “Enzyme Linked Immunosorbent Assay”- Teste sorológico Imunoenzimático

Fc- Porção da molécula da imunoglobulina

Pp65- Proteína matricial de peso molecular 65 kD

PCR- Reação em cadeia da polimerase

Mab- anticorpo monoclonal

EDTA- Ácido etilenodiaminotetracético

Rpm- rotação por minuto

M- Molar

Tris- Tris (hidroximetil) aminometano

dH<sub>2</sub>O- Água destilada, deionizada e estéril

ml- Mililitros

mM- Milimolar

pmol- Picomoles

dNTP- Desoxirribonucleotídeos trifosfato

µl- Microlitros

ACR- Colégio Americano de Reumatologia

EDTA- Ácido etileno diaminotetracético

CREA- Creatinina

ALB- Albumina

GVHD ou DECH- Graft *versus* host disease ou doença do enxerto contra o hospedeiro.

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1-</b>	Critérios para diagnóstico de Lúpus Eritematoso Sistêmico	46
<b>Tabela 2-</b>	Critérios para diagnóstico de LES	72
<b>Tabela 3-</b>	Seqüência de Primers Externos.....	80
<b>Tabela 4-</b>	Seqüência de Primers Internos.....	81
<b>Tabela 5-</b>	Seqüência de Primers da região da Beta Globina.....	82
<b>Tabela 6-</b>	Total de Exames realizados durante o estudo.....	87
<b>Tabela 7-</b>	Características dos 40 pacientes incluídos no estudo.....	88
<b>Tabela 8-</b>	Características dos pacientes estudados em relação ao SLEDAI grupo A (ATIVOS).....	89
<b>Tabela 9-</b>	Características dos pacientes estudados em relação ao SLEDAI grupo B (NÃO ATIVOS).....	90
<b>Tabela 10-</b>	Resultados dos testes de monitorização laboratoriais nos pacientes com LES.....	91
<b>Tabela 11-</b>	Achados Clínico-laboratoriais dos pacientes estudados que apresentaram Infecção ativa pelo HCMV.....	92
<b>Tabela 12-</b>	Pacientes e Prováveis Fatores de risco do LES para desenvolvimento de doença por HCMV.....	95
<b>Tabela 13-</b>	Causa de Provável Doença pelo HCMV.....	95
<b>Tabela 14-</b>	Causa dos Óbitos.....	96



## **LISTA DE FIGURAS**

---

<b>Figura 1-</b>	Estrutura Viral Do Citomegalovírus Humano.....	52
<b>Figura 2-</b>	Reação em Cadeia da Polimerase.....	63
<b>Figura 3-</b>	Reação de Imunoperoxidase (ANTIGENEMIA).....	78
<b>Figura 4-</b>	Análise Direta do Fragmento Amplificado Após Eletroforese em Gel de Agarose 2%, HCMV.	82
<b>Figura 5-</b>	Análise Direta do Fragmento Amplificado Após Eletroforese em Gel de Agarose 2%, beta globina.	83

---

**GRÁFICO 1-** Resultado dos Testes de Monitorização Laboratorial 91  
em Relação à Infecção Ativa pelo HCMV  
(CITOMEGALOVÍRUS).....

---

***RESUMO***

Doenças Infecciosas são uma das maiores causas de complicações que ameaçam à vida dos pacientes com doenças reumáticas. O citomegalovírus, um betaherpesvírus, é o maior causador de morbidade e mortalidade em indivíduos imunossuprimidos, podendo causar febre e danos a órgãos como, pulmão, fígado, trato gastrointestinal, medula óssea e retina. Pacientes com LES fazem uso de imunossupressores e estão sob risco de reativar a infecção latente pelo HCMV. Os pacientes HCMV-IgG positivos que usam imunossupressores devem ser monitorizados usando a N-PCR e/ou HCMV antigenemia para que o tratamento antiviral precoce possa suprimir a reativação viral e conseqüentemente a doença associada. Diante do exposto, foram monitorizados 40 pacientes com diagnóstico de Lúpus Eritematoso Sistêmico (SLE) em relação à infecção ativa pelo citomegalovírus humano (HCMV) utilizando as técnicas de Nested-PCR (N-PCR) e Antigenemia (AGM). Foi também verificado o status sorológico IgM e IgG anti-HCMV por ELISA. Para tanto, foram necessárias 2 amostras de sangue por paciente, obtidas através de punção venosa. Os pacientes encontravam-se em diferentes estágios da doença lúpica ou tratamento específico. Os objetivos deste estudo foram: detectar a presença do DNA e do antígeno *pp65* do HCMV utilizando as técnicas de N-PCR e AGM, respectivamente, em amostras de sangue periférico de pacientes com LES; verificar o impacto clínico causado pela infecção ativa e doença por HCMV nos pacientes desta casuística; verificar a presença das imunoglobulinas IgG e IgM anti-HCMV pelo método de ELISA. Todos os pacientes apresentaram sorologia IgG-HCMV reagente. Dos pacientes estudados, 4/40 (10%) apresentaram infecção ativa pelo HCMV detectado por N-PCR e/ou AGM. Destes, 3 estavam com a doença lúpica em atividade (SLEDAI  $\geq$  6). Entre os pacientes com infecção ativa pelo HCMV, 2/4 (50%) apresentaram sintomas compatíveis com doença por HCMV. Um destes pacientes foi à óbito por sepse de foco pulmonar, compatível com doença por HCMV. Apesar da infecção ativa por HCMV não ser freqüente nos pacientes com LES, quando ocorre é de extrema gravidade, podendo levar o paciente à óbito. A utilização de diagnóstico precoce da infecção ativa pelo HCMV é muito importante, pois permite um tratamento mais precoce e mais efetivo em relação ao diagnóstico sorológico,

principalmente em pacientes com falha imunológica como os pacientes deste estudo.

■

***ABSTRACT***

## **Active HCMV infection (HCMV) in patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE)**

Infectious diseases are a major cause of life-threatening in patients with rheumatic disease. The cytomegalovirus, a betaherpesvirus, is the major cause of morbidity and mortality in immunosuppressed hosts may cause fever and damage to organs such as lung, liver, gastrointestinal tract, bone marrow and retina. Patients with SLE make use of immunosuppressive and are at risk of reactivate latent infection by HCMV. The HCMV-IgG seropositive patients using immunosuppressive should be monitored using the N-PCR and/or HCMV antigenemia for the early antiviral treatment can suppress viral reactivation and consequently the associated disease. Given the foregoing, monitored 40 patients were diagnosed with Systemic Lupus Erythematosus (SLE) for the active infection by the human cytomegalovirus (HCMV) using the techniques of nested-PCR (N-PCR) and Antigenemia (AGM). It was also checked the status serum IgM and IgG anti-HCMV by ELISA. For both, were needed 2 samples of blood per patient, obtained by venipuncture. The patients were in various stages of the disease lupus or specific treatment. The objectives of this study were: to detect the presence of DNA and antigen of the *pp65* HCMV using the techniques of N-PCR and AGM, respectively, in samples of peripheral blood of patients with SLE; verify the clinical impact caused by active infection and disease by HCMV patients in this series; verify the presence of immunoglobulins IgG and IgM anti-HCMV by the method of ELISA. All patients had serology IgG-HCMV reagent. Of the patients studied, 4/40 (10%) had active infection by HCMV detected by N-PCR and/or AGM. Of these, 3 were in lupus activity (SLEDAI  $\geq$  6). Among patients with active infection by HCMV, 2/4 (50%) had symptoms consistent with disease by HCMV. One of these patients developed sepsis with pulmonar focus and died probably by HCMV. Despite the active HCMV infection were uncommon in these patients, the outcome are often fatal. The use of early diagnosis tests of active infection by HCMV is very important because it allows a treatment earlier and more effective in relation to the serological diagnosis, especially in patients with immunity fail as the patients in this study.

**Key Words: Cytomegalovirus, SLE, antigenemia.**



## *Introdução*

## **1. Introdução**

### **1.1 Histórico do Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES)**

O Lúpus é uma doença conhecida desde 1828, quando foi primeiramente descrito pelo dermatologista francês, Biett. Os primeiros estudos eram simples descrições da doença, com ênfase nos problemas da pele. Um dermatologista chamado Kaposi, 45 anos mais tarde, notou que alguns pacientes com lesões na pele típicas do Lúpus, mostravam sinais de que os órgãos internos também estavam afetados. Nos idos de 1890, Willian Osler, um famoso médico americano, observou que o Lúpus podia afetar órgãos internos sem lesões na pele. Em 1948, Malcon Hargraves da Clínica Mayo descreveu a célula LE, como sendo uma célula em partículas encontrada no sangue de pacientes com LES (Lúpus Eritematoso Sistêmico). Sua descoberta permitiu que os médicos identificassem mais casos de LES usando simplesmente um exame sanguíneo. Como resultado, durante os anos seguintes o número de casos de LES cresceu com regularidade. Desde 1954, várias proteínas incomuns (anticorpos), que agem contra os tecidos do paciente foram associadas ao LES. A detecção dessas proteínas anormais tem sido usada para desenvolver testes mais sensíveis ao diagnóstico do LES (teste do anticorpo anti-núcleo). A presença desses anticorpos pode ser resultado de outros fatores que não o LES (WALACE *et al*, 1993).

### **1.2 Definição**

O Lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica do tecido conjuntivo caracterizada por alterações auto-imunes e grande polimorfismo de manifestações clínicas. Essa patologia pode acometer um ou mais órgãos ou sistemas, de forma concomitante ou consecutiva com evolução e prognóstico muitas vezes imprevisíveis (QUAGLIATO *et al*, 1989 *et al*, SATO *et al*, 1994, MATOS CARNEIRO *et al*, 1997), sendo assim de amplo espectro de manifestações, e clinicamente caracterizada por

períodos de exacerbações e remissões com curso e prognósticos variáveis. (SATO *et al*, 2004).

### 1.3 Epidemiologia do LES

➤ Sua incidência é mais freqüente no sexo feminino, entre mulheres jovens, particularmente na idade reprodutiva, na proporção de 9:1 em relação aos homens, sendo menos freqüente na infância e nos idosos (SATO *et al*, 1994, WALLACE & METZGER, 1996).

➤ Pode ocorrer em qualquer idade: sendo que o pico de início dos sintomas varia entre 15 e 45 anos, com média de idade de 30 anos, à época do diagnóstico (SCOTTON, 2000).

➤ Prevalência: O LES é uma doença de distribuição universal, com prevalência variável entre as diversas regiões do planeta. Nos Estados Unidos a doença é três vezes mais comum entre mulheres negras do que brancas, tendo uma prevalência que varia de 14,8 a 50,8 casos/100.000 habitantes (GLADMAN & UROWITZ, 1994, HOCHBERG, 1993). Na Inglaterra, Japão e Suécia a prevalência dessa patologia tem sido estimada respectivamente em 12, 21 e 39 pacientes por 100.000 habitantes (GLADMAN & UROWITZ, 1994, HOCHBERG *et al*, 1995). Na Inglaterra, a prevalência é maior entre afro-caribenhos com 207 casos/100.000 habitantes, seguidos por asiáticos e brancos (48,8 e 20,3 casos/100.000 habitantes, respectivamente) (GLADMAN & UROWITZ, 1998). Estudos epidemiológicos realizados na última década sugerem que o lúpus é mais comum entre certas populações asiáticas (filipinos e chineses) e mais prevalentes no continente africano do que se imaginava anteriormente. Nos EUA observa-se uma maior prevalência e gravidade entre hispânicos e índios do que entre os brancos (WALLACE *et al*, 1999).

➤ No Brasil: embora não existam estudos epidemiológicos sobre esta enfermidade, acredita-se que a prevalência seja alta tanto em adultos quanto em crianças (CHAHAD *et al*, 1995, MARINI & COSTALLAT, 1999) sendo que alguns autores têm relatado uma maior incidência de LES em mulheres caucasóides. Esse achado pode estar refletindo a composição do grupo de indivíduos estudados, embora a alta miscigenação da nossa

população muitas vezes dificulta a caracterização da raça (QUAGLIATO *et al*, 1989, COIMBRA, 1991, SATO *et al*, 1991, COSTALLAT, 1992; HILÁRIO *et al*, 1992, COIMBRA, 1993).

➤ Descrito em todas as raças, mas não se distribui igualmente entre elas: Segundo Bonfá e Borba Neto, (Borba EF; Bonfá E, 2001) o LES acomete uma em cada 1.000 pessoas da raça branca e uma em cada 250 pessoas da raça negra. Embora seja mais prevalente na raça negra, pode ocorrer em todas as etnias e regiões geográficas. Relatos na literatura apontam que algumas doenças, e entre elas o LES, não somente afetam com maior frequência minorias populacionais, mas também apresenta um prognóstico menos favorável entre elas (FESSEL, 1974; WARD & STUDENSKI, 1990; JOHNSON *et al*, 1995; KARLSON *et al*, 1997). Tais características têm sido relacionadas a diferenças biológicas geneticamente determinadas. O estudo do prognóstico do lúpus, entre grupos raciais, merece cuidado. Segundo os antropologistas, raça implica em indivíduos geneticamente homogêneos, o que somente seria possível em grupos humanos totalmente isolados, o que geralmente não é o caso. Da mesma forma, a literatura médica tem enfatizado o quão arbitrárias e relativas podem ser as designações raciais (MCKENZIE & CROWCROFT, 1994; HUTH, 1995; MCKENZIE & CROWCROFT, 1996; BHOPAL, 1997; FUSTINONI & BILLER, 2000). A maioria dos estudos em lúpus e também em outras condições, está mais relacionada a grupos étnicos que a grupos raciais, ou seja, esses estudos são realizados entre indivíduos que dividem a mesma cultura ancestral, origem geográfica, linguagem e um sistema de tradições, crenças e comportamentos que lhes confere um importante elo entre si (ALARCON & LOWE, 2001).

## **1.4 Etiologia do LES**

Em relação à etiologia e fisiopatogenia do lúpus, apesar dos avanços ocorridos nas últimas décadas, alguns aspectos permanecem obscuros. Assim, admite-se que a interação de fatores genéticos, virais, hormonais e ambientais, de forma ainda não totalmente esclarecida, participe do desencadeamento e desenvolvimento da doença

(COSTALLAT, 1995). Estudos realizados em hispânicos, negros e brancos, concluíram, que além da origem étnica, fatores sócio-econômicos, imunológicos, imunogenéticos, comportamentais e psicológicos são variáveis importantes a serem consideradas no desencadeamento da doença (ALARCON *et al*, 1999).

Alguns fatores estão implicados na etiologia da doença:

- **Fatores Genéticos:** Parecem exercer importante papel no desenvolvimento do Lúpus eritematoso sistêmico. O risco relativo de desenvolvimento do LES entre familiares é cerca de 6,8 vezes maior quando comparados a uma população controle (GLADMAN & UROWITZ, 1998). No que diz respeito aos antígenos leucocitários humanos, uma maior frequência de HLA-DR2 e DR3 tem sido demonstrada em pacientes com lúpus (LAHITA, 1997; FERNANDES *et al*, 1998; EROGLU & KOHLER, 2002). Estudos realizados em doentes caucasóides brasileiros, sugerem que o HLA - DR2 pode ter importante papel na suscetibilidade ao LES bem como o HLA- DR3 parece estar associado à nefrite lúpica (FERNANDES *et al*, 1998).

- **Fatores hormonais:** Em relação aos fatores hormonais, observa-se um predomínio da doença em mulheres na fase adulta, durante a gestação, no pós-parto e durante o uso de anticoncepcionais orais, em particular aqueles que contêm estrógenos, uma vez que estes aumentam a produção de autoanticorpos e são capazes de ocasionar depressão da imunidade celular (HOCHBERG *et al*, 1997; CAMERON *et al*, 1999; WALLACE, 1999).

- **Fatores ambientais:** Quanto aos fatores ambientais, o antecedente de exposição solar aparece em cerca de 36% dos pacientes com lúpus em atividade e o número de novos casos ou de exacerbação da doença, em países de clima frio, encontra-se elevado no verão e nos últimos meses da primavera (ROTHFIELD *et al*, 1993). O desencadeamento do lúpus pela luz ultravioleta poderia ser explicado pela indução de células T supressoras ou pelo aumento da apoptose dos queratinócitos (WALLACE, 1999).

- **Estresse Psicológico:** Este fator é considerado por muitos estudiosos, como de particular importância no desencadeamento da doença e de suas agudizações. (AYACHE, 2005).

- **Fatores Infeciosos:** Agentes infecciosos também participam no desencadeamento da doença, embora nenhum estudo tenha provado uma etiologia viral definida para a doença (CAMERON, 1999, UTHMAN, 1999). De fato, muitos estudos tem tido os agentes infecciosos como agente etiológico de doenças reumáticas, embora vários argumentos sugerem que sim. Por outro lado, tem sido mostrado que as infecções podem também proteger contra doenças auto-imunes de acordo com a hipótese da higiene inicialmente formulada para as doenças alérgicas (Bach, 2005).

Três mecanismos têm sido propostos em relação aos efeitos das infecções nas doenças auto-imunes:

- Ativação policlonal dos linfócitos;
- **Mimetismo Molecular:** A principal função do sistema imune é distinguir antígenos estranhos dos componentes próprios. Quando um indivíduo é infectado, por exemplo, por vírus este patógeno ele é seqüestrado e começa uma resposta celular e conseqüentemente a produção de anticorpos contra aquele vírus. O que acontece na teoria do mimetismo, é que os anticorpos produzidos contra antígeno específicos, reconhecem também células do próprio organismo que por sua vez é parecido com o antígeno já reconhecido anteriormente. A doença auto-imune é uma resposta imunológica contra um antígeno próprio. Os possíveis mecanismos envolvidos na auto-imunidade são: reatividade cruzada entre Ag de microorganismos estruturalmente similares aos antígenos próprios; quando um peptídeo próprio deixa de ser tolerado a reação inflamatória provoca a aparição de mais autoantígenos = Dispersão de epítomos. (Barzilai O, *et al*, 2007; Oldstone, 1998; Bach, 2005)
- Imunogenicidade aumentada por auto-antígenos de órgãos secundários à inflamação mediada pelas infecções.

Vários agentes infecciosos induzem uma inflamação localizada em órgãos alvo, como ocorre por vírus. Essa informação pode ser a origem de uma resposta auto-imune específica do órgão ao qual poderá perpetuar a inflamação. (Bach, 2005).

O binômio lúpus-infecção por HCMV ainda não está bem esclarecido, sendo que as manifestações clínicas de ambos (da infecção ativa pelo HCMV e atividade da doença lúpica) ocorrem concomitantes, dificultando um diagnóstico diferencial preciso (SANTOS, 1998; YODA *et al*, 2006).

### 1.5 Critérios para diagnóstico e classificação do LES

Para o diagnóstico do LES, costuma-se utilizar os critérios de classificação propostos em 1982 (Tan EM, *et al*, 1982; Hochberg MC, 1997). O diagnóstico se baseia 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 antinucleares (Cecil *et al*, 2004) (Tabela 1).

**Tabela 1:** Critérios para diagnóstico e classificação de Lúpus Eritematoso Sistêmico.

CRITÉRIO	DEFINIÇÃO
Erupção 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
Fotossensibilidade	Erupção cutânea como 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 4000mm <sup>3</sup> em duas ou mais ocasiões; Linfopenia inferior a 1500 mm <sup>3</sup> em duas ou mais ocasiões ou Trombocitopenia menos de 100000 mm <sup>3</sup> na ausência de medicamentos responsáveis.
Anticorpo Anti-nuclear*	Um título anormal de anticorpo antinuclear por imunofluorescência ou por um 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 nuclear; falso-positivo para sífilis por pelo menos seis meses; anticorpos antifosfolípideo

---

Cecil *et al*, 2004.

## 1.6 Índices utilizados para medir a atividade do Lúpus Eritematoso Sistêmico

Reconhecer o grau de atividade da doença em um paciente com LES é de grande importância, já que muitas decisões terapêuticas se baseiam nessa avaliação (Bittencourt, R, *et al*, 2003; Saiki, RK, *et al*, 1988).

Liang *et al*, 1988, faziam referência acerca de 60 sistemas já criados com a intenção de definir e medir a atividade em LES. Nos anos 80, a preocupação com a validade e comparabilidade desses índices gerou alguns estudos (Bezerra, ELM, *et al*, 2005; Kasapcopur O, *et al*, 2006; Rus V, *et al*, 2002), com a busca de índices que pudessem ser mais amplamente utilizados, tendo sido, inclusive, realizados "workshops" com este fim.<sup>103</sup>

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 (*Lupus Activity index*) (Bombadier C, *et al*, 1992; Liang MH, *et al*, 1988).

Os itens constantes do SLEDAI com suas respectivas pontuações são os seguintes: convulsões (8), psicose (8), síndrome cerebral orgânica (8), distúrbios visuais (8), alterações dos nervos cranianos (8), cefaléia do LES (8), acidente cerebrovascular (8), vasculite (8), artrite (4), miosite (4), cilindros urinários (4), hematúria (4), proteinúria (4),



piúria (4), novo “rash” (2), alopecia (2), úlceras de mucosa (2), pleurite (2), pericardite (2), complemento baixo (2), positividade para anticorpos anti-DNA ou aumento de título, de acordo com o método utilizado para sua determinação) (2), febre (1), trombocitopenia (1), leucopenia (1). (Bombadier C, *et al*, 1992; Liang MH, *et al*, 1988).

## 1.7 TRATAMENTO DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

A maior parte dos sintomas decorrentes do Lúpus Eritematoso Sistêmico deve-se a inflamação e, assim sendo, o tratamento destina-se a reduzir essa inflamação. Quatro grupos de medicamentos são usados para tratar pacientes com Lúpus,

- Os Antiinflamatórios não-esteróides (AINEs) são utilizados para controlar a dor provocada pela artrite. Em geral, estes medicamentos são prescritos apenas por pequenos períodos de tempo, com instruções para diminuição da dosagem conforme ocorram melhoras na artrite.
- Os glicocorticóides como a prednisona ou a prednisolona são utilizados para reduzir a inflamação e para imunossuprimir a atividade alterada do sistema imunitário. São as principais terapias para o Lúpus eritematoso. Em geral, o controle inicial da doença não pode ser alcançado sem administração diária de glicocorticosteróides por um período de várias semanas ou meses, requerendo a manutenção destes medicamentos durante muitos anos. A dose inicial e a frequência da sua administração dependem da gravidade da doença e dos sistemas orgânicos afetados. Empregam-se normalmente elevadas doses orais ou intravenosas de glicocorticóides no tratamento de anemia hemolítica grave, de doença do sistema nervoso central e dos tipos mais graves de envolvimento renal. As crianças têm uma sensação evidente de bem estar e aumento de energia no espaço de dias após o início da terapia com glicocorticóides. Após a melhora dos sintomas, a redução das doses do medicamento é feita gradualmente até a dose mínima que manterá o bem estar do paciente.

Os agentes Imunossuppressores como a azatioprina e a ciclofosfamida agem de modo diferente dos glicocorticóides. Suprimem a inflamação e tendem ainda a diminuir a resposta do sistema imunitário. Estes medicamentos podem ser utilizados quando os glicocorticóides por si só não conseguem controlar o LES ou quando os glicocorticóides causam efeitos secundários graves. (Sato EI; *et al*, 2002)

### **1.8 Infecções por Citomegalovírus em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico**

O Citomegalovírus é um dos agentes virais mais importantes em pacientes imunossuprimidos. Em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, infecções são uma das principais causas de morte nestes pacientes, superando até mesmo a mortalidade causada pela atividade da própria doença (Haiashi T, *et al*, 1998). A identificação dos pacientes com infecção ativa pelo HCMV é um marcador precoce para selecionar pacientes com alto risco de desenvolver doença por HCMV, permitindo um melhor prognóstico a esse grupo de risco (Costa SCB, *et al*, 1994; Costa SCB, *et al*, 1999; Bonon SHA, *et al*, 2006; Mori T, *et al*, 2004; Tanaka Y, *et al*, 2008; Kashiwagi Y, *et al*, 2007).

Pacientes lúpicos tem grande propensão para desenvolver infecções (Rosner S, *et al*, 1982; Denman AM, 2000; Sekigawa I, *et al*, 2002; Sekigawa I, *et al*, 2001) não só devido à imunossupressão induzida pela própria doença como pelo uso de vários medicamentos utilizados para seu tratamento. (Hellmann DB *et al*, 1987; Segal BH *et al*, 1997; Sato EI, *et al*, 2004)

É importante o diagnóstico diferencial entre atividade da doença lúpica e a doença por HCMV, lembrando da possibilidade da coexistência de ambas: assim como a existência da co-morbidade (Magalhães MB *et al*, 2003). Entretanto, o binômio lúpus-infecção por HCMV é marcado por uma série de pontos ambíguos e intrigantes, tais como:

- O HCMV é um dos agentes virais implicados na etiologia desta doença e/ou na indução de surto agudo da mesma;

- Muitas das manifestações clínicas da infecção ativa por HCMV, se confundem com as do próprio lúpus, dificultando um diagnóstico diferencial preciso (Santos DD *et al*, 1998; Yoda Y *et al*, 2006; Bonon SHA *et al*, 2006).

A coexistência de infecção ativa por HCMV 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 (Santos DD *et al*, 1998; Kasapcopur O *et al*, 2006; Kang I *et al*, 2004; Denman AM, 2000; Sekigawa I, *et al*, 2002; Sekigawa I, *et al*, 2001; Ayashi DG *et al*, 2005; Mori T, *et al*, 2004; Katagiri A, *et al*, 2008; Yoda Y, *et al*, 2006; Chang M, *et al*, 2005). Além da semelhança entre os sintomas, a confusão entre as doenças pode ser aumentada pelo fato dos indivíduos com infecção ativa por HCMV poderem apresentar FAN (fator anti-núcleo) e fator reumatóide transitoriamente positivos e pacientes com testes positivos para fator reumatóide poderem apresentar falso IgM positivo para citomegalovírus (Ravel R *et al*, 1995; Horwitz CA *et al*, 1986; Cannavan FPS *et al*, 1998).

Estudo com sorologia IgM e IgG anti-HCMV pelo método de ELISA, realizado em 1998 por Cannavan e colaboradores em pacientes com lúpus, mostrou que resultados falsos positivos para IgM anti HCMV, podem ocorrer devido à presença de autoanticorpos relacionados ao lúpus. (Cannavan FPS *et al*, 1998)

Também a elevação de títulos IgG tem sido observado em pacientes com LES e pode refletir a ativação inespecífica de linfócitos B. (Ravel R *et al*, 1995; Horwitz CA *et al*, 1986; Cannavan FPS *et al*, 1998).

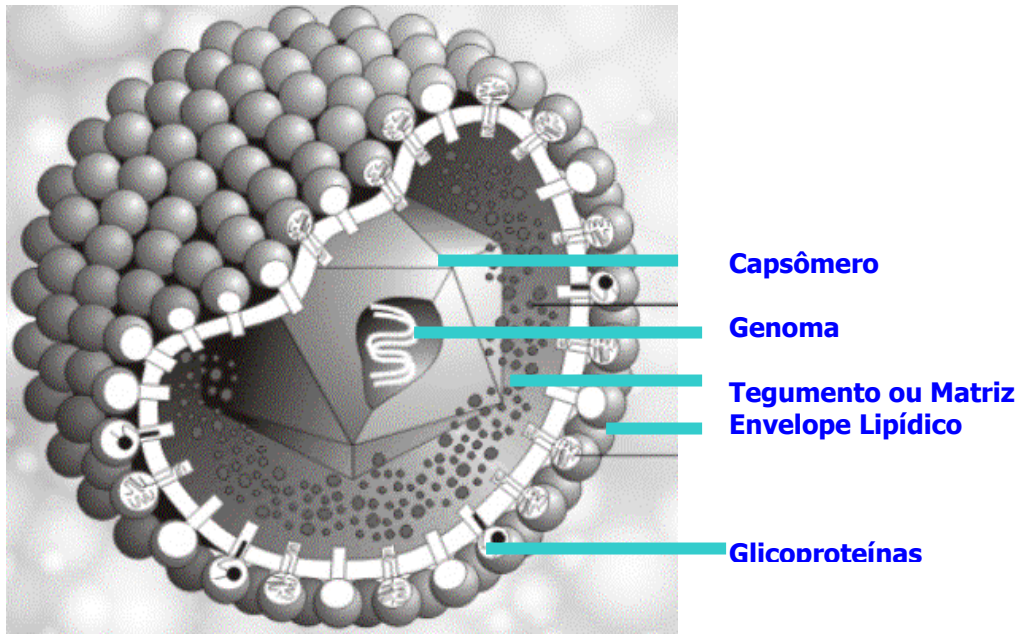
Para evitar o risco de obter resultados falso-positivos com os testes de ELISA, métodos de diagnóstico de infecção ativa pelo HCMV mais específicos devem ser considerados. Em particular, os testes de PCR e antigenemia são de grande utilidade na detecção da infecção ativa pelo HCMV (Zhang, *et al*, 2001) por serem precoces, específicos e sensíveis.

## 1.9 CITOMEGALOVÍRUS HUMANO

O citomegalovírus, também conhecido como HHV-5, é um herpesvírus humano, classificado como um beta herpesvírus, baseado em critérios morfológicos e bioquímicos. A morfologia dos vírus do grupo herpes era desconhecida até 1960, quando foi observado por microscopia eletrônica, capsídeo, protéico de forma icosaédrica, rodeado por uma camada amorfa de proteínas, tegumento, e envolvido por uma bicamada lipídica, onde se encontram as glicoproteínas virais. Devido à semelhança morfológica e à presença do DNA de fita dupla, o citomegalovírus foi considerado um membro do grupo herpes. Em 1973, o grupo de estudos dos herpesvírus do Comitê Internacional para Nomenclatura dos Vírus decidiu não utilizar o termo “citomegalovírus” e recomendou que fosse dado um número arábico a todos os herpes vírus: o citomegalovírus humano ficou classificado como Herpesvírus Humano 5 (HHV-5). Em 1979 este comitê reabilitou o nome de citomegalovírus e dividiu a família *Herpesviridae* em 3 subfamílias representando os vírus herpes simples (*Alphaherpesvirinae*), citomegalovírus, herpesvírus humano tipo 6 e tipo 7 (*Bethaherpesvirinae*) e o grupo dos vírus linfoproliferativos (*gammaherpesvirinae*) (HO, 1991; BROWN & ABERNATHY, 1998; JUNQUEIRA, 2008).

### 1.9.1- Estrutura Viral

O Citomegalovírus possui um diâmetro de aproximadamente 200nm, e consiste de: 1) um core linear, com fita dupla de DNA; 2) um capsídeo icosaédrico de aproximadamente 150 nm de diâmetro contendo 162 capsômeros; 3) um material amórfico e assimétrico contendo glicoproteínas virais em sua superfície (envelope) (ZAIA, 1990)



Fonte: Copyright 1994 – 97 Marko Reschke

**Figura 1- Estrutura viral do citomegalovírus humano (HCMV)**

O tamanho do genoma do HCMV é de aproximadamente 230 Kilobases (229.354 pares de bases-Gene Bank NC001347) ou massa molecular relativa de  $150-155 \times 10^6$  e uma densidade de  $1.716-1.717 \text{ g/cm}^3$  correspondente a 58% de guanosina e citosina.

Este grande genoma codifica mais de 200 proteínas e é composto de duas regiões únicas definidas como longa (UL) e curta (US), flanqueada por seqüências repetidas invertidas localizadas internamente (IRL e IRS) e nas extremidades (TRL TRS) (CHEE *etal*, 1990; STINSKI, 1990).

### 1.9.2 - Fisiopatologia

Uma característica peculiar desse vírus é a sua capacidade de latência. Assim, após uma infecção primária, geralmente assintomática, o vírus não é eliminado do organismo e, como outros herpesvírus, permanece de forma latente no hospedeiro e sua viremia se mantêm em níveis reduzidos. Em diferentes circunstâncias, ele pode ser

reativado como, por exemplo, em casos de gestação, uso de drogas imunossupressoras, AIDS ou qualquer outro fator que altere o sistema imune. O HCMV é um vírus lítico que causa um efeito citopático *in vitro* e *in vivo*. Quando o hospedeiro é infectado, o DNA do HCMV pode ser encontrado em diferentes linhagens celulares e órgãos do corpo. Na infecção inicial, o HCMV infecta as células epiteliais das glândulas salivares, resultando em uma infecção persistente (local de latência viral). O HCMV infecta também o sistema geniturinário, especificamente os túbulos proximais do rim próximo das áreas corticais. Virúria é muito comum e tem pouca consequência clínica. Apesar da replicação viral no rim, é raro ocorrer disfunção renal. Uma exceção pode acontecer em indivíduos que receberam transplante de rim, no qual o HCMV é associado à glomerulopatia e possível causa de rejeição do enxerto (GOODRICH, 2001; JUNQUEIRA, 2008).

### **1.9.3 - Ciclo de Replicação e Regulação Gênica do HCMV**

O ciclo de replicação, apesar de possuir replicação inteiramente intracelular, o que impede a ação de anticorpos neutralizantes, o HCMV pode ser facilmente inativado por fatores físico-químicos. Sua vida média a 37°C é de 45min. O único reservatório para transmissão do HCMV em humanos é o homem. (JUNQUEIRA, 2008).

No hospedeiro natural, algumas células são mais susceptíveis à infecção que outras. (STINSKI, 1990). Os mecanismos moleculares que determinam a permissividade das células para a replicação do HCMV não são entendidos, mas sabe-se que o vírus pode penetrar uma variedade de células humanas e não-humanas sem que ocorra a replicação. Conclui-se, desse modo, que fatores celulares determinam as consequências da infecção pelo HCMV após a entrada viral (MOCARSKI *et al.*, 1990; PLACHTER, SINZGER & JAHN, 1996).

O ciclo de replicação do HCMV é lento em cultura celular e rápido no hospedeiro (EMERY *et al.*, 1999), persistindo latente, podendo se reativar em alguns momentos de imunossupressão, caracterizando-se como um agente oportunista. O HCMV é citopático, podendo produzir destruição tecidual em vários tecidos, como, por exemplo, trato gastrointestinal, pulmões, cérebro, etc (ALFORD & BRITT, 1990).

No hospedeiro natural, algumas células são mais susceptíveis à infecção que outras. (STINSKI, 1990). Os mecanismos moleculares que determinam a permissividade das células para a replicação do HCMV não são entendidos, mas sabe-se que o vírus pode penetrar uma variedade de células humanas e não-humanas sem que ocorra a replicação. Conclui-se, desse modo, que fatores celulares determinam as consequências da infecção pelo HCMV após a entrada viral (MOCARSKI *et al.*, 1990; PLACHTER, SINZGER & JAHN, 1996).

Para iniciar a infecção, é necessário que o vírus seja adsorvido aos receptores de superfície celular, resultado de uma cascata de interações entre proteínas virais e celulares, seguido da fusão do envelope viral com a lamela externa da membrana citoplasmática. (Silva *et al.*, 2000; Landolfo *et al.*, 2003).

A replicação do DNA viral começa entre 14-24 horas após a infecção e incorporação do material genético, um pequeno número de genes é transcrito, codificando proteínas que regulam sua expressão; estas proteínas são denominadas de antígenos imediatamente precoces (IEA) e estimulam a produção de proteínas denominadas de antígenos precoces (EA). Os antígenos são expressos nas membranas celulares e a seguir nas nucleares. Antígenos tardios (LA) tem função constitucional e são expressos após replicação do DNA (STRAUS, 1990; COLIMON & MICHELSON, 1990; JUNQUEIRA, 2008).

O HCMV e outros tipos de citomegalovírus que infectam outras espécies de animais são altamente espécies-específicas, mas suas características de replicação e síndromes da doença que acarretam são similares (ALFORD & BRITT, 1990; HO, 1991; PANUTTI, 1984). Muitas cepas de HCMV circulam continuamente na população em geral (VAN DER MERR *et al.*, 1996).

#### **1.9.4 Epidemiologia e Transmissão**

A infecção pelo HCMV é comum na maioria da população, infectando 0,5 a 1,0% de todos os recém-nascidos e mais ou menos 50% da população adulta em países

desenvolvidos. A prevalência em países europeus, Austrália e América do Norte varia de 40 a 60%, enquanto que em populações de nível sócio-econômico mais baixo, a prevalência é significativamente maior, variando entre 80 a 100%. A prevalência de anticorpos contra o HCMV (anti-HCMV) eleva-se com a idade, atingindo níveis máximos após os 25 anos (PANNUTI, 1984; HARDY *et al.*, 1985; NICHOLS & BOECKH, 2000).

No Brasil, os dados epidemiológicos disponíveis são restritos a algumas áreas urbanas, tais como o estado de São Paulo. Estudos usando soros coletados de pessoas saudáveis de diferentes grupos de idade em São Paulo e testados para anticorpos anti-HCMV mostraram que em crianças de 0-4 anos de idade a soroprevalência era de 60%, com um lento aumento após os 15 anos de idade e 80% de positividade no grupo de idade entre 51 a 60 anos (ALMEIDA *et al.*, 2001); a experiência de nosso laboratório demonstra uma soroprevalência de 93%. (BONON *et al.*, 2004)

Aproximadamente 10% das infecções primárias em pacientes imunocompetentes estão associadas com a síndrome da mononucleose, caracterizada por mal-estar, febre e linfocitose atípica. A grande maioria das infecções primárias passa despercebida. O vírus então permanece latente no endotélio e em células mononucleares do sangue periférico, durante todo o tempo de vida do hospedeiro, controlada pela imunovigilância imunológica mediada por linfócitos T (NICHOLS & BOECKH, 2000).

O HCMV é transmitido por: a) via parenteral, através de sangue ou seus derivados; b) contato inter-humano; c) via materno-fetal, através do canal de parto, contágio pós-parto ou transmissão intra-uterina e, d) transplantes de órgãos (VERONESI *et al.*, 1991).

Os humanos são os únicos reservatórios de HCMV e a transmissão ocorre através do contato pessoa-a-pessoa. Recém-nascidos e crianças podem ser infectados durante o nascimento pela passagem através do cérvix uterino contaminado, durante o período pós-natal através do leite materno ou durante a infância através de contato direto com outras crianças em berçários ou creches e pode estar associado com seqüelas graves. Representa a causa mais comum de retardo mental e distúrbios da audição em crianças. Após a puberdade, transmissão salivar e sexual representa o modo mais



importante de infecção por HCMV (deJONGetal.,1998).Com relação à epidemiologia em grupos de alto risco, sabe-se que pacientes imunossuprimidos, como os transplantados, os portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e aqueles que são submetidos à quimioterapia têm maior risco de desenvolver a doença por HCMV (COSTA, 1999).

Existem três padrões epidemiológicos da infecção por HCMV: infecção primária, reativação de infecção latente e reinfecção (RUBIN, 1990).

- Na infecção primária, a fonte viral pode ser pré-natal (transmissão transplacentária) (EPPS et al., 1995), transfusão intrauterina (VILMER & PÉROL, 1984), perinatal (secreção cervical) e pós-natal (urina infectada, saliva, leite materno) (EPPS et al., 1995), transfusão de sangue e transplante de órgãos (TEGTMEIER, 1989; FORMAN & ZAIA, 1994).
- A reativação é induzida pela alteração no relacionamento parasita-hospedeiro devido a mecanismos fisiológicos, tal como ocorre na gravidez por um decréscimo natural das defesas imunológicas; nas doenças debilitantes ou pelo emprego de drogas imunossupressoras e procedimentos cirúrgicos (DRAGO et al., 2000).
- A reinfecção é devida a um vírus novo com um diferente tipo antigênico (TEGMEIER, 1989). Embora seja epidemiologicamente importante distinguir reinfecção e reativação, ambas são clinicamente similares. O termo infecção recorrente, portanto, é freqüentemente usado para descrever ambas possibilidades. Em adultos normais, a infecção por HCMV pode ser também considerada uma doença sexualmente transmissível sendo mais prevalente em mulheres com infecção gonocócica anterior ou atual (LESHER, 1988).

### **1.9.5 PATOGÊNESE**

Em um paciente imunocompetente, a maior parte do vírus é destruída, por células T citotóxicas específicas para HCMV e a infecção permanece por um quadro assintomático. A presença dessa infecção assintomática é baseada na detecção do HCMV nos fluídos corporais. O período de incubação, após a infecção, é de 4 a 12 semanas,

quando o antígeno já pode ser detectado. Neste período há o aparecimento de IgM-HCMV ou, mais tarde, aumento de 400% de títulos de anticorpos IgG-HCMV. No entanto em paciente imunocomprometidos que não receberem tratamento adequado para infecção, a infecção pode tornar sintomática e com o possível envolvimento de órgãos. (JUNQUEIRA, 2008)

Em geral, a patogênese do HCMV é similar à dos outros herpesvírus. Eles compartilham a capacidade de: 1) disseminar de célula-a-célula mesmo na presença de anticorpos circulantes; 2) estabelecer um estado latente no hospedeiro; 3) reativar em condições de imunossupressão, e 4) induzir no mínimo imunossupressão transitória no receptor (DREW, 1988; SWEET & SMITH, 1990).

A patogênese da doença por HCMV envolve (1) o papel da infecção progressiva do vírus, (2) o efeito da infecção pelo HCMV na função celular, (3) a interação do HCMV com linhagens de células hematopoiéticas; (4) a fuga da vigilância imune mediada pelo HCMV e (5) o papel da aloreatividade e GVHD na infecção pelo HCMV nos casos de Transplante de medula óssea (TMO)(ZAIA, 1999).

### **1.9.6 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS**

A doença em imunocompetentes quando se manifesta assume forma semelhante à mononucleose infecciosa, classicamente caracterizada por febre de duração prolongada, fraqueza, sudorese, mialgia, hepatomegalia, esplenomegalia ou ambos, e adenopatia. Linfonomegalia e exsudato amigdaliano são pouco encontrados, ao contrário do que se verifica na mononucleose infecciosa causada pelo vírus Epstein-Barr. Icterícia e exantema maculopapular podem ser eventualmente observados. Em relação aos exames laboratoriais, o hemograma pode apresentar linfocitose relativa e absoluta e presença de grande número de linfócitos atípicos. Os marcadores hepáticos (ALT e AST) podem estar moderadamente elevados em cerca de 80% dos casos (WELLER, 1971a; WELLER, 1971b; PANUTTI et al., 1987; PANUTTI et al., 2001).

Porém, o vírus pode ser um importante patógeno em pacientes com defeitos de imunidade celular (AIDS, leucemia, linfoma), em receptores de TMO (Transplante de

Medula Óssea), TCTH (Transplante Células Tronco Hematopoéticas) e de órgãos sólidos e aqueles submetidos a quimioterapia antineoplásica. Uma vez ocorrida a infecção, o HCMV pode permanecer latente, em equilíbrio com o organismo infectado, reativando a atividade viral quando houver diminuição da imunidade do hospedeiro, caracterizando o HCMV como agente oportunista. Um dos fatores que mais têm contribuído para o aumento da ocorrência da infecção por HCMV é o emprego cada vez mais comum de drogas imunossupressoras (PANUTTI et al., 1984; HO, 1990; MYERS & AMSTERDAM, 1997). Com o aumento da prevalência de AIDS, a infecção por HCMV transformou-se em um grave problema de saúde pública nos vários países do mundo. Devido à profunda e complexa deficiência imunológica causada pelo HIV, o HCMV freqüentemente causa doença disseminada nesse grupo de doentes. As complicações infecciosas são as maiores causas de ameaça à vida dos pacientes com doenças reumáticas (Wasko, 2004; Watts, 2003; Kang I, Park SH, 2003).

Em pacientes transplantados, com câncer e pacientes com doenças reumáticas, a freqüência e a gravidade da infecção e de suas manifestações clínicas são bastante variáveis. Nestes pacientes a doença se apresenta com sinais de síndrome de mononucleose sendo que o achado principal é febre de duração variável. Em ordem de freqüência podem ser observados: hepatomegalia, esplenomegalia, mialgia e/ou artralgia, elevações dos marcadores hepáticos e linfocitose. Linfócitos atípicos são menos evidentes nesses pacientes e, particularmente, devido à imunossupressão, leucopenia ocorre mais freqüentemente que leucocitose, juntamente com anemia e trombocitopenia. Após a síndrome da mononucleose, a pneumonia por HCMV é a mais freqüente manifestação em pacientes imunossuprimidos. A infecção concomitante por fungos, bactérias gram-negativas e/ou *Pneumocystis carinii* é comum. Hepatite com hepatomegalia, anormalidades de testes de função hepática e icterícia são observados em 7 a 16% de transplantes renais. Coriorretinite secundária ao HCMV é outra entidade clínica cuja freqüência tem aumentado em pacientes imunossuprimidos, especialmente nos portadores de AIDS. O trato gastrointestinal vem cada vez mais sendo atingido pelo HCMV, principalmente nos pacientes com AIDS. O cólon é o local mais freqüentemente acometido, seguido pelo esôfago, reto e intestino delgado. As manifestações clínicas no

trato gastrointestinal dependem do nível e grau de acometimento do órgão, bem como da ocorrência ou não de infecções concomitantes ou tumores (GRUNDY, 1990).

### **1.9.7 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE INFECÇÃO ATIVA POR HCMV**

A introdução de testes laboratoriais rápidos e precoces tem permitido aos clínicos detectar a replicação viral e diagnosticar, portanto, a infecção ativa por HCMV antes do início da doença. Isso proporciona a oportunidade de iniciar o tratamento antiviral precocemente (SIA & PATEL, 2000). Essa então chamada terapia precoce (“pre-emptive therapy”) é definida como tratamento altamente efetivo administrado por um curto período, em indivíduos que estão com um alto risco de desenvolver doença por HCMV (RUBIN, 1991).

O diagnóstico precoce da infecção por HCMV pode ser realizado por: imunocitoquímica de fibroblastos humanos infectados, o DEAFF (detection of early antigen fluorescent foci) ou “shell vial” (GRIFFITHS *et al.*, 1984); a expressão da fosfoproteína de 65 kDa (pp65) da matriz do HCMV em leucócitos do sangue periférico, então chamado antigenemia (VAN DER BIJ *et al.*, 1988a, VAN DER BIJ *et al.*, 1988b), a reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação de seqüências de ácidos nucléicos virais (DEMLER, 1988; SHIBATTA, 1988; JIWA *et al.*, 1989; EINSELE *et al.*, 1995) e outros métodos moleculares, tais como a PCR quantitativa (COBAS), Nuclisens pp67 Nasba, Captura híbrida (RECOMMENDATIONS OF CDC, 2000).

Os dois métodos de detecção de infecção ativa amplamente utilizados para o tratamento precoce são a antigenemia e N-PCR.

### **1.9.8 Detecção do antígeno pp65 do HCMV em sangue periférico (antigenemia)**

O método da antigenemia tem sido considerado um grande avanço no diagnóstico da infecção por HCMV em transplantes de órgãos. A presença de antigenemia em leucócitos do sangue periférico proporciona um marcador precoce de infecção ativa pelo HCMV e é um teste rápido (VAN DER BERG *et al.*, 1991). Esse método depende do uso de anticorpos monoclonais que detectam o antígeno viral pp65, uma proteína

estrutural expressa nos leucócitos do sangue durante a fase precoce do ciclo de replicação do HCMV.

Este teste é limitado à detecção de antígenos virais nos leucócitos. O resultado não é somente qualitativo, mas é também quantitativo, correlacionando a viremia com a gravidade da doença clínica (LO et al., 1997; NIUBÓ et al., 1996; THE et al., 1992).

O teste de antigenemia consiste de várias fases incluindo o isolamento dos leucócitos do sangue periférico pela sedimentação com dextran, lise direta de leucócitos, preparação de lâminas microscópicas, imunocoloração com o uso de anticorpos monoclonais (C10 e C11) contra o HCMV, avaliação microscópica e contagem quantitativa (ERICE et al., 1995; HO et al., 1998; THE et al., 1995; THE et al., 1990). As lâminas citocentrifugadas contêm um dado número de células que são preparadas por centrifugação com um sobrenadante rico em leucócitos. A fixação das lâminas é feita ou com acetona ou formaldeído; resultados superiores foram obtidos com a fixação com formaldeído (BOECKH et al., 1994; GERNA et al., 1992; THE et al., 1992).

A imunodetecção do antígeno do HCMV é possível através dos métodos de imunoperoxidase indireta ou imunofluorescência indireta (THE et al., 1995).

Em 1988, Van der Bij *et al*, acreditavam que diagnósticos rápidos de infecção ativa por HCMV eram de grande importância para evitar o excesso de tratamento com drogas imunossupressoras (em receptores de transplantes) e guiar a terapia antiviral. A demonstração do HCMV em amostras de sangue é particularmente importante porque a viremia por HCMV é considerado um marcador de infecção ativa e tem demonstrado boa correlação com doença grave. A detecção do antígeno de HCMV em leucócitos do sangue periférico (antigenemia) tem sido demonstrada como uma técnica rápida (5 horas) e sensível na detecção de HCMV (VAN DER BIJ et al., 1988a; THE et al., 1990).

O teste de antigenemia é um método sensível para a estimativa da carga viral sistêmica do HCMV. O método é uma boa escolha para laboratórios com baixo a médio volume de testes, sendo considerado o mais adequado para guiar o início da terapia precoce e para a monitorização da eficácia do tratamento com ganciclovir (GONDO et al., 1994). A desvantagem é que a amostra deve ser processada em curto espaço de tempo,

sendo recomendável até 8 horas após a coleta para não haver a diminuição da sensibilidade e em pacientes com grave neutropenia o exame não pode ser realizado devido à baixa contagem de granulócitos. Alternativamente, a PCR para HCMV no plasma ou soro poderá ser realizada nessa situação (SOLANO et al., 2001; BOECKH & BOIVIN, 1998; BOECKH et al., 1992).

### **1.9.9 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)**

Com a introdução da amplificação de DNA por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (SAIKI et al., 1985), a detecção do HCMV foi levada a efeito em amostras contendo pequeno número de cópias do vírus (SHIBATA *et al.*, 1988; DEMMLER *et al.*, 1988; OLIVE *et al.*, 1989). A amplificação gênica por PCR permite a produção de grandes quantidades de fragmentos específicos de DNA a partir de substratos complexos e em concentrações diminutas. Basicamente, este procedimento permite a amplificação de um fragmento de DNA escolhido, cuja concentração final excede em milhares de vezes a do DNA presente na amostra analisada (COSTA *et al.*, 1992).

Este procedimento consiste em repetidos ciclos de síntese de DNA por meio de dois iniciadores (“primers”) com orientações opostas, isto é, dois segmentos de aproximadamente 20 nucleotídeos, com seqüências complementares às duas extremidades do fragmento alvo, e levadas a efeito por reação enzimática mediada por uma polimerase, com atividade em altas temperaturas (“Taq polimerase”). Cada ciclo de reação é constituído por três fases: separação das hélices de DNA a ser amplificado; ligação complementar entre os “primers” e o DNA; e síntese do DNA pela Taq polimerase. A orientação dos “primers” faz com que a síntese de DNA ocorra na região interna entre eles. Assim, o produto da extensão de um “primer” é utilizado como substrato para o outro, o que resulta em cada ciclo, na duplicação da quantidade de DNA sintetizada pelo ciclo precedente. Assim, o número de cópias do fragmento alvo tem um aumento exponencial, o que faculta no final de 30 ciclos um aumento na ordem de  $10^6$  cópias, partindo-se de uma única molécula (SAIKI et al., 1985; SHIBATA et al., 1988; JUNQUEIRA, et al, 2008)

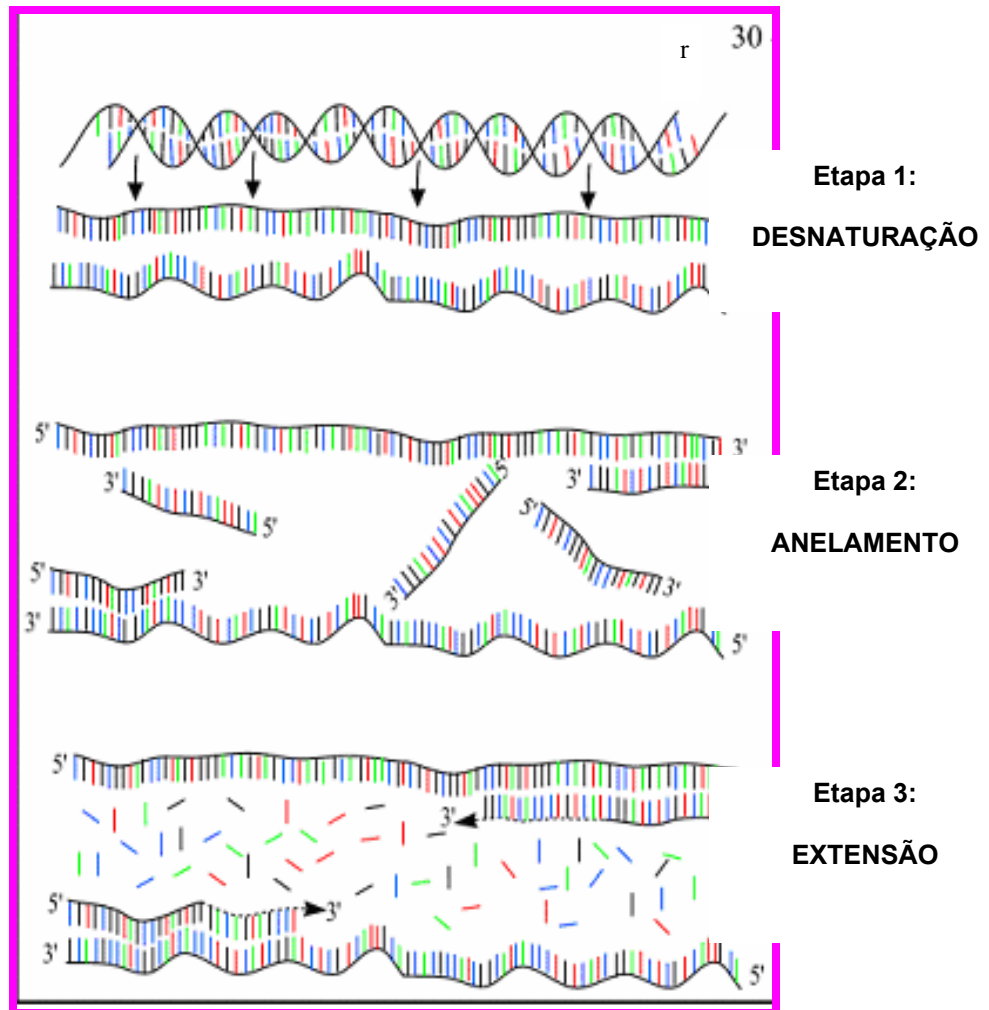
A PCR é um método rápido (4-6 horas), específico e extremamente sensível, porém, devido a sua alta sensibilidade, os principais problemas são os falso-positivos resultantes da contaminação na execução do teste. Resultados falso-negativos podem ser causados pela variabilidade genética das cepas do HCMV ou pela presença de inibidores (THE et al., 1992). Uma importante vantagem da PCR em relação à antigenemia (pp65) é que as amostras podem ser estocadas em temperatura ambiente por mais de 72 horas sem uma diminuição significativa nos níveis de DNA (ROBERTS et al., 1997).

O aumento da especificidade e sensibilidade da PCR foram alcançados pela “Nested-PCR”, onde o produto da primeira PCR, amplificada com um par de “primers”, é submetido à nova reação de amplificação utilizando-se um par de “primers” internos ao primeiro, sendo o produto então detectado por eletroforese em gel de agarose (BRYTTINGetal,1991).

O Ciclo de reação de amplificação é constituído por três fases distintas:

- **Desnaturação:** separação da dupla fita do DNA a ser amplificado;
- **Anelamento:** ligação complementar entre os iniciadores (primers) e o DNA;
- **Extensão:** síntese do DNA pela enzima Taq-polimerase, que é utilizada para replicar as fitas do DNA.

#### REAÇÃO DA CADEIA EM POLIMERASE (PCR)



**Figura 2 : Reação em Cadeia da polimerase (Andy Vierstraete, 1999).**  
<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html> – com modificações

A infecção por HCMV foi muito pouco documentada em pacientes com doenças reumáticas, principalmente em lúpus. Atualmente mais atenção tem sido dada ao vírus e aos métodos de detecção de infecção ativa que estão cada vez mais acessíveis. Os testes sorológicos utilizados demonstram não ter valor para uma detecção precoce e muitas vezes a ocorrência de IgM-HCMV positivo pode ser uma reação cruzada com anticorpos do próprio indivíduo podendo ocorrer resultados falso-positivos (Takizawa, 2008).

O teste de antigenemia é um dos métodos consagrados para o diagnóstico da infecção ativa pelo HCMV, pois detecta a proteína *pp-65*, específica do vírus em células polimorfonucleares. Este teste tem sido correlacionado com o curso clínico e com a



doença por HCMV em pacientes transplantados e com AIDS e é amplamente utilizado como marcador de reativação viral ou o sinal para dar início à terapia antiviral. Em pacientes com lúpus, pode ser extremamente útil. Como no Brasil não há trabalhos enfocando a infecção ativa pelo HCMV em pacientes com LES, estudados a partir de métodos de diagnóstico precoces e específicos como a Nested-PCR e a antigenemia, este trabalho foi realizado.

## ***OBJETIVOS***

- Detectar a presença do DNA e do antígeno *pp65* do Citomegalovírus Humano, utilizando as técnicas de Nested-PCR e antigenemia, respectivamente, em amostras de sangue periférico de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico seguidos no serviço de Reumatologia do Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas/ UNICAMP;
  
- Verificar o impacto clínico causado pela infecção ativa e doença por HCMV nos pacientes dessa casuística.
  
- Verificar a presença das imunoglobulinas G e M anti-HCMV através do teste sorológico tipo ELISA nos pacientes estudados e comparar os resultados obtidos com os testes diagnósticos, antigenemia e N-PCR.

## *Métodos e Casuística*

### **3 CASUÍSTICA**

Foram estudados prospectivamente 40 pacientes com diagnóstico de LES, em seguimento na enfermaria e no ambulatório do serviço de Reumatologia, Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, em relação à infecção ativa e doença causadas pelo HCMV. A pesquisa ocorreu no período de novembro de 2006 a novembro de 2007. Nos pacientes seguidos ambulatorialmente, foram feitas 2 coletas de sangue com intervalo de um mês. Em pacientes internados as coletas foram feitas semanalmente.

Todos os pacientes incluídos neste estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (anexado), aprovado pelo “Comitê de Ética em Pesquisa”, bem como o projeto para esta pesquisa da instituição (anexado).

As amostras de sangue foram colocadas em tubos contendo como anticoagulante EDTA, para a realização da antígenemia, Nested-PCR e sorologia.

#### **3.1 Critérios para inclusão dos pacientes no estudo:**

1. Pacientes com diagnóstico de LES de acordo com ACR.
2. Consentimento do paciente para coleta de amostras de sangue para a análise;
3. Monitorização adequada do paciente com LES em relação à ocorrência de infecção ativa e doença pelo HCMV.

#### **3.2 Critérios para suspensão ou encerramento:**

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

3. O estudo dar-se-á por encerrado quando houver um número de pacientes suficientes, aproximadamente 40, para serem feitas análises conclusivas sobre os dados obtidos a partir dos objetivos propostos.

### 3.3- Critérios para diagnóstico do LES

**Tabela 2: Critérios para diagnóstico de LES.**

<b>CRITÉRIO</b>	<b>DEFINIÇÃO</b>
Erupção 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
Fotossensibilidade	Erupção cutânea como 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 4000mm <sup>3</sup> em duas ou mais ocasiões; Linfopenia inferior a 1500 mm <sup>3</sup> em duas ou mais ocasiões ou Trombocitopenia menos de 100000 mm <sup>3</sup> na ausência de medicamentos responsáveis.
Anticorpo Anti-nuclear*	Um título anormal de anticorpo antinuclear por imunofluorescência ou por um 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 nuclear; falso-positivo para sífilis por pelo menos seis meses; anticorpos antifosfolípideo

Cecil *et al*, 2004.

### **3.4- Critérios Utilizados para Verificar o Índice de Atividade do Lúpus nos pacientes estudados:**

Foi utilizado neste trabalho o índice **SLEDAI** e será considerado fator de risco para o desenvolvimento da doença por HCMV (**anexo 1**) (BOMBARDIER *et al*, 1992). O SLEDAI apresenta-se como um formulário com 24 itens, que a soma dos valores encontrados pode variar de 0 a 105 pontos. Pacientes que preencheram os itens e somados resultaram em valor **igual ou maior que 6 pontos**, foram considerados em atividade para o Lúpus.

### **3.5- De acordo com o SLEDAI foram considerados dois grupos.**

Foi considerado grupo 1 para pacientes que apresentaram LES **ativos** e grupo 2 LES **não ativos**.

### **3.6- CRITÉRIOS UTILIZADOS PARA DEFINIÇÃO DE INFECÇÃO ATIVA POR HCMV.**

A presença de pelo menos um dos itens abaixo foi considerada indicativa de infecção ativa por HCMV:

- **Nested PCR** - duas ou mais reações positivas, consecutivas (EINSELE *et al.*, 1995);
- **Antigenemia** - uma ou mais células antígeno-positivas para HCMV, detectadas nos leucócitos polimorfonucleares (BOECKH *et al.*, 1999)

### 3.6.1 CRITÉRIOS UTILIZADOS PARA DEFINIÇÃO DE DOENÇA POR HCMV

Para caracterização de doença por HCMV, além das evidências laboratoriais de infecção ativa citadas acima, fez-se necessária a presença de manifestações clínicas compatíveis com aquelas sabidamente causadas pelo HCMV (LJUNGMAN & PLOTKIN, 1995; LJUNGMAN et al., 2002):

- **Pneumonia (HCMV-IP)** - a presença de sinais e/ou sintomas de doença pulmonar combinado com a detecção do HCMV em lavado brônquio-alveolar ou biópsia de pulmão. A detecção deverá ser realizada por cultura celular, testes histopatológicos, análise imunohistoquímica ou hibridização in situ.
- **Doença Gastrointestinal (HCMV-TGI)** - sintomas gastrointestinais (colite, gastrite ou esofagite) associados com histologia ou imunohistoquímica positiva para HCMV de biópsias de lesões macroscópicas do trato gastrointestinal;
- **Hepatite** - O vírus deverá ser demonstrado em biópsias hepáticas (por cultura, imunohistoquímica, hibridização “in situ” ou PCR) em combinação com:
  - Aumento de pelo menos duas vezes o valor máximo normal de alanina-amino-transferase (ALT);
  - Achados histopatológicos consistentes com hepatite ou colangite;
- **Doenças Neurológicas** - Sintomas como encefalite, mielite transversa ou outros sinais de doença difusa do sistema nervoso central juntamente com a detecção de HCMV em fluido cerebroespinal por PCR, por cultura ou detecção do antígeno;



- **Retinite** - lesões oftalmológicas típicas, com ou sem provas virológicas, diagnosticadas pelo exame de fundo de olho, realizado pelo oftalmologista, com presença de retinite necrosante com infiltrado branco algodinoso, áreas de hemorragia e irite e vitrite mínima (PANUTTI et al, 1996).

## **4. Métodos**

Neste estudo, foram realizadas as seguintes técnicas:

- Antigenemia para detecção e quantificação do antígeno pp65 do HCMV, no sangue periférico;
- Reação em cadeia da polimerase tipo “Nested”, para detecção de DNA do HCMV, no sangue periférico;
- Teste sorológico para verificação dos títulos de IgG-HCMV e IgM-HCMV;

### **4.1- Antigenemia - Detecção do antígeno pp65 do HCMV em neutrófilos do sangue periférico.**

A detecção do antígeno pp65 foi realizada de acordo com o método descrito por Van der Bij et al., 1988; Van der Bij et al., 1989; Jiwa et al., 1989 e Boeckh, 1992, com algumas modificações:

#### **4.1.1 Extração de leucócitos polimorfonucleares do sangue Periférico**

As amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo como anticoagulante EDTA, encaminhadas e processadas no prazo de até 6 horas após a coleta. Foram coletados de 5 a 10 ml de sangue. Este material foi transferido para tubos de plástico de 15 ml (tipo Falcon). Os leucócitos foram separados pela sedimentação com dextran a 5% diluído em PBS, pH 7.4 (sangue/dextran na proporção 4:1); homogeneizado gentilmente por inversão e colocado em estante

inclinada para tubos em ângulo de 45 graus por 30 minutos em estufa à temperatura de 37°C. Usando Pipeta tipo Pasteur, o sobrenadante rico em leucócitos polimorfonucleares foi transferido para outro tubo de plástico de 15 ml e centrifugado 10 minutos a 1200 rpm. A seguir, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento celular foi agitado no vórtex vigorosamente. Para remoção das células vermelhas persistentes, o sedimento celular foi suspenso em 10 ml da solução de cloreto de amônio gelado, pH 7.4, homogeneizado e mantido em temperatura de 4°C por 10 minutos, seguido de centrifugação a 1200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado novamente e o sedimento celular foi lavado com PBS e centrifugado 10 minutos a 1200 rpm, mais 2 ou 3 vezes. O sedimento celular foi então ressuspensionado em 200 µl a 1000 µl de PBS; dependendo da quantidade de leucócitos (após transplante, a contagem de células brancas pode ser muito baixa, sendo necessário a ressuspensão em 200 µl).

#### **4.1.2 Preparação das lâminas**

Os leucócitos foram contados em câmara de Neubauer e para cada amostra preparou-se uma suspensão com 1,5 a  $2 \times 10^6$  células/ml. 100 µl desta suspensão foram colocados no interior do citofunil e em seguida centrifugados em citocentrífuga (Marca Revan – modelo Citociclo) por 5 minutos à 970 rpm ; as lâminas foram feitas em duplicata. A seguir, as lâminas foram secas, fixadas com CMV PO<sup>TM</sup> kit (Reagente C - IQ Products) por 10 minutos, lavadas 3 vezes com PBS e permeabilizadas com CMV PO<sup>TM</sup> kit (Reagente D - IQ Products) por 5 minutos. Após nova lavagem, as lâminas foram novamente secas, embrulhadas em papel manteiga e papel alumínio e estocadas à temperatura de - 80° C, até o momento da revelação.

Após a preparação das lâminas, o precipitado de leucócitos remanescente foi utilizado para o teste da Nested PCR.

#### **4.1.3 Coloração das lâminas**

As lâminas foram desembrulhadas, secas e a área da reação delimitada com esmalte. O anticorpo monoclonal utilizado foi o da marca Iq-Products (Netherlands), contendo uma combinação de anticorpos monoclonais C-10 e C-11, que reconhecem o antígeno pp65 do HCMV. Após a secagem do esmalte, as lâminas foram rinsadas com PBS e escorridas. A seguir, foram aplicados 35 µl de monoclonal diluído 1:10 em PBS por área de reação e incubado em câmara úmida à temperatura ambiente por 45 minutos. A área de reação a partir deste ponto não pode secar. A seguir, as lâminas foram lavadas 3 vezes, 5 minutos cada, com PBS. O conjugado utilizado foi o anti-mouse (Horse Radish Peroxidase labeled goat anti-mouse IgG) do laboratório BIOTEST AG. Foi aplicado 35 µl do conjugado “anti-mouse peroxidase” diluído 1:50 em PBS na área da reação. Então, as lâminas foram incubadas à temperatura ambiente em câmara úmida por 30 minutos e após, lavadas por 3 vezes com PBS, 5 minutos para cada lavagem. Após as lavagens, as lâminas foram cobertas com a solução de AEC (amino-etil-carbazol - Sigma), recém-preparada (20 mg de AEC dissolvida em 5 ml de dimetilformamida - Sigma e em 100 ml de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4.9) e adicionado 50 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30%. As lâminas foram deixadas na solução de AEC, no escuro, por 8 minutos, à temperatura ambiente. A seguir, foram lavadas por 10 minutos com tampão acetato de sódio 0.1 M, pH 4.9. Finalmente, lavadas 3 vezes com PBS, 1 minuto, 2 minutos, 5 minutos e coradas com hematoxilina de Mayer, marca MERCK, (na diluição 1:10), por 20 a 30 segundos, rinsadas com água destilada até eliminar todo o corante e montadas com glicerina tamponada.

#### 4.1.4 Leitura e interpretação das lâminas

Para a leitura das lâminas foi utilizado um microscópio óptico da marca Nikon, aumento de 40 vezes e foram observadas:

- **Células HCMV antígeno pp65 positivas:** identificada pela coloração marrom característica, nuclear ou perinuclear, principalmente em leucócitos polimorfonucleares; ocasionalmente em monócitos.



**Figura 3. Reação de imunoperoxidase (antigenemia).**

- **Células antígeno-positivas pp65 do HCMV:** identificadas pela coloração castanho-avermelhada nuclear ou perinuclear em leucócitos polimorfonucleares; Células negativas – núcleo azul. Os leucócitos foram preparados em lâminas microscópicas, fixadas com paraformaldeído/NP40 e submetidos à coloração com imunoperoxidase com a utilização dos anticorpos monoclonais C10/C11.
- **Células HCMV antígeno pp65 negativas:** núcleo azul.

Controles positivos foram utilizados em todas as reações e consistia de lâminas congeladas de um ou mais pacientes com antigenemia sabidamente positiva ou controles comerciais (fibroblastos fetais humanos infectados com HCMV).

## **4.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE TIPO NESTED PCR**

### **4.2.1 Extração de DNA**

A extração do DNA genômico de leucócitos foi realizada a partir do precipitado de leucócitos extraídos com Dextran 5%, anteriormente descrito.

#### **4.2.2 Lise de Leucócitos**

Ao precipitado de leucócitos foi adicionada uma solução de NaOH 50mM e incubado por 20 minutos a 100°C. Posteriormente foi adicionada uma solução de Tris HCl (pH 7,5) e centrifugado por 5 minutos para formação do precipitado de restos celulares. O sobrenadante foi transferido para tubo tipo eppendorf estéril.

#### **4.2.3 Amplificação Gênica do HCMV pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

##### **Condições da reação:**

A Reação em Cadeia da Polimerase para HCMV seguiu o método descrito por (SHIBATA et al., 1988; DEMMLER et al., 1988), com algumas modificações.

Cada reação de amplificação utilizou 0,5 a 0,7 µl do DNA (obtido pelo método de extração de DNA anteriormente descrito) em volume total de 20 µl, contendo 50 mM de cloreto de potássio, 10 mM de Tris (pH 8.4), 2,5 mM de cloreto de magnésio, 0,1 mM de cada “primer” MIE 4 e MIE 5 (Tabela 4 – ver sequência de nucleotídeos), 200 mM da mistura desoxirribunucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e 1 unidades de Taq DNA polimerase.

Foram complementados 35 ciclos de amplificação para cada amostra e cada ciclo foi constituído de 3 etapas: a) separação das hélices de DNA por aquecimento a 94° C durante 1 minuto; b) ligação complementar entre os “primers” e o DNA em temperatura de 55° C por 1 minuto (anelamento) e c) síntese do DNA pela Taq polimerase, em temperatura de 72° C por 1 minuto (extensão).

Os ciclos foram realizados automaticamente em equipamento apropriado (“DNA Thermal Cycler” - Perkin Elmer Cetus, Norwalk, Conn, EUA).

#### 4.2.4 Iniciadores (“primers”) externos

Foram usados dois iniciadores que flanqueiam uma região conservada nas diversas cepas de vírus HCMV, não amplificando DNA de outros herpes-vírus

**Tabela 3- Seqüência dos primers externos que flanqueiam uma região conservada do genoma do HCMV, utilizados na PCR.**

<i>Primers externos *</i>	Seqüência	Sentido
<b>MIE 4</b>	CCA AGC GGC CTC TGA TAA CCA AGC C	“sense”
<b>MIE 5</b>	CAG CAC CAT CCT CCT CTT CCT CTG G	“antisense”

\*MIE = Principal antígeno imediatamente precoce - Human cytomegalovirus (Towne) major immediate-early antigen (MIE) gene, exon 4. (GeneBank HS5MIE4).

§ Expresso como número de nucleotídeos. Os nucleotídeos são numerados seqüencialmente dentro de cada gene.

O par de primers denominados primers MIE, amplificam uma seqüência de 435 pares de base do DNA do HCMV que codifica uma porção do antígeno “major immediate-early” (MIE) do HCMV (cepa Towne). A porção do gene MIE que é amplificado está contido no exon 4 deste gene (DEMMLER, 1988).

#### 4.2.5 Reamplificação do genoma do HCMV pela NESTED PCR

Utilizando-se do mesmo método descrito acima, uma alíquota do DNA amplificado na primeira reação foi reamplificado utilizando um par de “primers” interno.

**Tabela 4 - Seqüência de primers internos que flanqueiam uma região conservada do genoma do HCMV utilizados na nested PCR.**

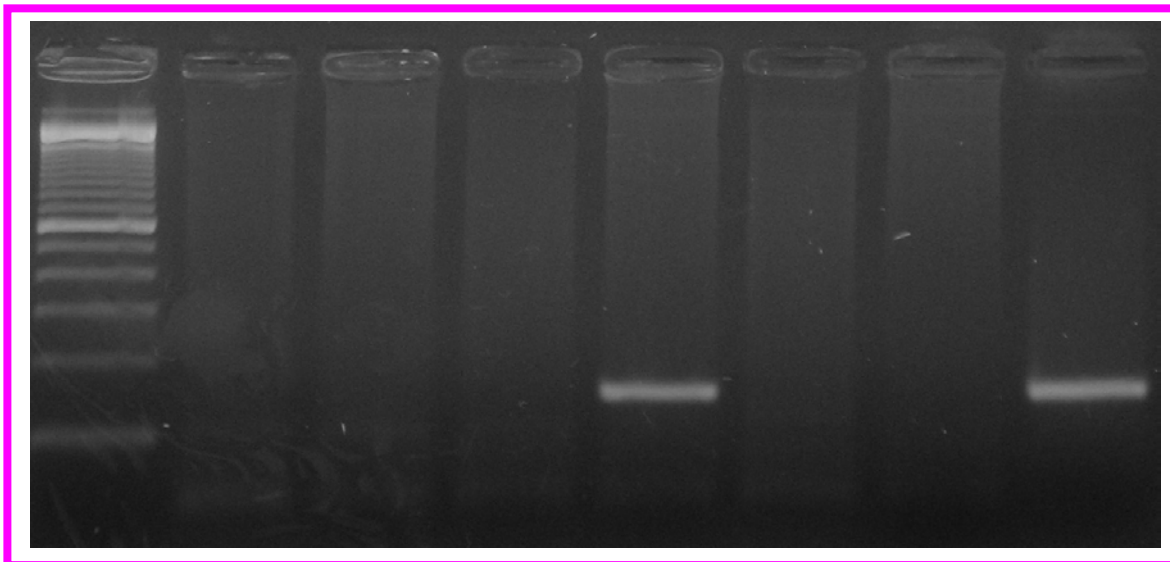
<b>Primer interno *</b>	<b>Seqüência</b>	<b>Sentido</b>
<b>IE 1</b>	CCA CCC GTG GTG CCA GCT CC	“sense”
<b>IE 2</b>	CCC GCT CCT CCT GAG CAC CC	“antisense”

\* IE = antígeno imediatamente precoce - Human cytomegalovirus (Towne) immediate-early antigen (IE) gene, exon 4. (GeneBank HS5MIE4).

§ Expresso como número de nucleotídeos. Os nucleotídeos são numerados seqüencialmente dentro de cada gene.

O par de primers denominados primers IE, amplificam uma seqüência de 159 pares de base do DNA do HCMV (Figura 8) que codifica uma porção do antígeno “immediate-early” (IE) do HCMV (cepa Towne). A porção do gene IE que é amplificado está contido no exon 4 deste gene. (STENBERG et al, 1984)

As condições da reação foram as mesmas utilizadas para fazer a primeira reação de amplificação (PCR).



**Figura 4- Análise direta do fragmento amplificado, após eletroforese em gel de agarose 2%.** Linha 1 – Marcador de peso molecular (ladder de 100 pb – GIBCO BRL); Linha 2 – controle negativo; Linha 3 – amostra negativo; Linhas 4 – amostra negativo; Linha 5-amostras de DNA de sangue positivas para HCMV (cepa AD169 do HCMV); Linha 6 e 7-negativas para o HCMV; Linha 8 – controle positivo (cepa AD 169 do HCMV). (159 pares de bases).

Para controle interno da reação de PCR foi feita uma PCR para amplificação do gene da Beta-Globina, identificando a presença de DNA nas amostras analisadas, para eliminar resultados falso-negativos por esse motivo. Os primers utilizados para flanquear essa região estão descritos a seguir. O fragmento observado é de 110 pares de base. Tabela 4.

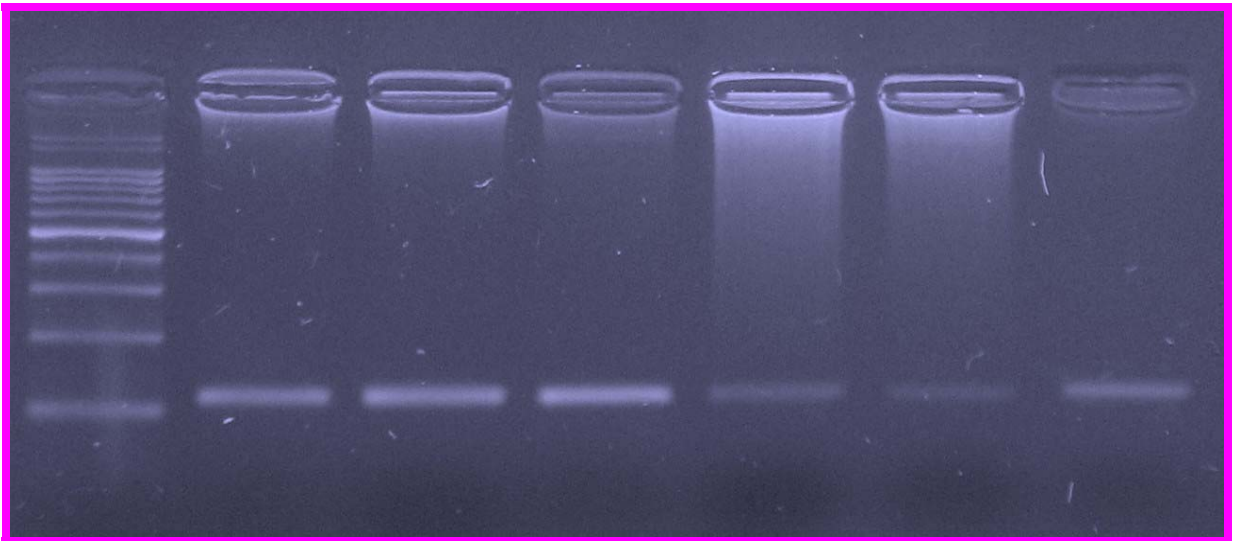
**Tabela 5-** Seqüência de primers que flanqueiam uma região conservada do gene da Beta-Globina utilizados na PCR.

Primer	Sequências (5'> 3')
<b>PCO3</b>	ACACAACCTGTGTTCACTAGC
<b>PCO4</b>	CAACTTCATCCACGTTTCACC



Quarenta ciclos de amplificação foram realizados automaticamente em equipamento apropriado (“DNA Thermal Cycler”-MJ,EUA). Os ciclos foram precedidos por um período de desnaturação inicial a 94°C por 7 minutos, para inativação de qualquer atividade de proteases que poderia interferir com a reação enzimática e, após o último ciclo, o período de extensão final (72°C) foi de 7 minutos.

- Desnaturação: 94°C – 1 minuto;
- Anelamento: 55°C – 1 minutos; 40 vezes
- Extensão: 72°C – 1 minuto.



**Figura 5- Análise direta do fragmento amplificado, após eletroforese em gel de agarose 2%.** Linha 1- Marcador de peso Molecular; Linhas 2,3,4,5,6,7 amostras de DNA de sangue positivas para o gene da beta globina (observado um fragmento de 122 pares de bases).

#### **4.2.6 Cuidados especiais utilizados para se evitar contaminação das amostras durante a reação da PCR.**

A fim de se eliminar problemas de contaminação das reações, o que poderia ocasionar resultados falso-positivos, foram tomados os seguintes cuidados:

- As amostras a serem amplificadas foram manipuladas em salas diferentes (sala pré-PCR) de onde a amplificação foi feita (sala pós-PCR);
- Todos os reagentes e materiais pré-PCR e pós-PCR foram preparados e utilizados em ambientes diferentes;
- Antes da abertura dos tubos de microcentrífuga foi efetuada rápida centrifugação para concentrar o líquido contido no tubo na região inferior e evitar sua dispersão por evaporação.
- Todo material plástico (ponteiras e tubos plásticos para PCR) utilizado foi novo e não autoclavado;
- Trocas constantes de luvas foram feitas durante todo o procedimento.

## ***Resultados***

## 5- RESULTADOS

### 5.1 TOTAL DE EXAMES REALIZADOS DURANTE A MONITORIZAÇÃO

Foram realizados neste estudo, 248 exames para detecção de infecção ativa pelo HCMV, incluindo os exames de N-PCR, (média 2 coletas por paciente) AGM e os sorológicos IgM e IgG anti-HCMV (n=80) nos 40 pacientes monitorizados (Tabela 5).

**Tabela 6. Total de exames realizados durante o estudo.**

	<b>POSITIVOS</b>	<b>NEGATIVOS</b>	<b>TOTAL</b>
<b>NESTED-PCR</b>	14 (16,6%)	70 (83,3%)	84
<b>ANTIGENEMIA</b>	2 (2,3%)	82 (97,6%)	84
<b>IgM-HCMV</b>	2 (5%)	38 (95%)	40
<b>IgG-HCMV</b>	40 (100%)	0	40
<b>TOTAL*</b>	58	190	248

### 5.2 CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES INCLUÍDOS NO ESTUDO

Participaram do protocolo de monitorização 40 pacientes portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico, sendo que 39 eram do sexo feminino e 1 do sexo masculino. A mediana da idade dos pacientes foi de 40 anos (variação 18 a 55 anos) (Tabela 7).

**Tabela 7. Características dos 40 pacientes incluídos no estudo.**

<b>Características dos pacientes</b>	<b>N(%)</b>	<b>Grupo 1 (LES ATIVO)</b>	<b>Grupo 2 (LES NÃO ATIVO)</b>
Número de Pacientes	40 (100%)	21/40 (52,5%)	19/40 (47,5%)
Sexo M/F	39 FEM (97,5%), 1 MASC (2,5%)	21 F/ (52,5%)	18F/ 1M
Idade em anos (mediana)	40 anos	38 anos	43,5 anos
IgG-HCMV+	40/40 (100%)	21/21 (100%)	19/19 (100%)
IgM-HCMV+	2/40 (5%)	1/21 (4,7%)	1/19 (5,2%)

### **5.3 Pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico Ativo e Não-Ativo**

Dentre os pacientes estudados, 52,5% foram classificados como doença lúpica em atividade (Grupo A) e 47,5% dos pacientes foram classificadas com doença lúpica Não Ativos (Grupo B). **Tabelas 8 e 9.**

**Tabela 8: Características dos pacientes estudados em relação ao SLEDAI, Grupo A (ATIVOS).**

<b>N</b>	<b>INICIAIS</b>	<b>SEXO</b>	<b>IDADE</b>	<b>INFECÇÃO ATIVA</b>	<b>CORTICÓIDES</b>	<b>IMUNOSSUPRESSORES</b>	<b>SLEDAI</b>
4	JMM	FEM	38	N	SIM	SIM	11
5	RST	FEM	29	N	SIM	SIM	10
		FEM	48		NÃO	SIM	6
6	MHLC			N			
9	EGS	FEM	27	N	SIM	SIM	8
12	SM	FEM	31	N	SIM	SIM	16
13	MJBS	FEM	29	sim	SIM	SIM	8
14	ALS	FEM	50	N	SIM	SIM	6
15		FEM	45				
	SRGS			sim	SIM	SIM	12
16	MEMF	FEM	43	N	SIM	NÃO	8
21	MPP	FEM	25	N	SIM	SIM	10
22	LSR	FEM	40	N	SIM	SIM	8
23	SAM	FEM	45	N	SIM	NÃO	6
25	KRO	FEM	42	N	SIM	NÃO	18
28		FEM	30				
	LRM			sim	SIM	SIM	12
34	MFF	FEM	43	N	SIM	SIM	6
35	GPC	FEM	28	N	SIM	NÃO	16
36	MMS	FEM	26	N	SIM	SIM	12
37	MPM	FEM	34	N	SIM	NÃO	12
39	ESP	FEM	36	N	SIM	SIM	11
40	RCSC	FEM	49	N	SIM	SIM	22
41	EAPS	FEM	50	N	SIM	SIM	8

**Corticóides utilizados:** Prednisona, Prednisolona, pulso de metilprednisolona.

**Imunossuppressores utilizados:** Azatioprina, Metotrexate, Ciclofosfamida, Ciclosporina, pulso de ciclofosfamida.

**Tabela 9: Características dos pacientes estudados em relação ao SLEDAI, Grupo B (NÃO-ATIVOS).**

<b>N</b>	<b>INICIAIS</b>	<b>SEXO</b>	<b>IDADE</b>	<b>INFECÇÃO CORTICÓIDES ATIVA</b>	<b>IMUNOSSUPRESSORES</b>	<b>SLEDAI</b>	
2	SLCF	FEM	53	N	SIM	0	
3	TCV	FEM	18	N	SIM	0	
7	NCSA	FEM	49	N	SIM	0	
8	ACS	FEM	31	N	SIM	0	
10	ADG	FEM	55	N	SIM	4	
11	LC	FEM	25	N	NÃO	0	
17	MBD	FEM	39	N	SIM	0	
18	RCDF	FEM	39	N	SIM	0	
19	SCCP	FEM	23	N	SIM	0	
20		FEM	42				
	IR			<b>sim</b>	SIM	NÃO	0
24	MIFSL	FEM	50	N	NÃO	NÃO	4
26	BFSS	MASC	18	N	SIM	SIM	0
27	APC	FEM	45	N	SIM	NÃO	0
29	CMT	FEM	23	N	SIM	SIM	0
30	MASP	FEM	50	N	SIM	NÃO	5
31	MAB	FEM	47	N	SIM	SIM	0
32	AEL	FEM	50	N	SIM	SIM	0
33	VLH	FEM	50	N	NÃO	NÃO	0

#### **5.4 INFECÇÃO ATIVA PELO CITOMEGALOVÍRUS HUMANO**

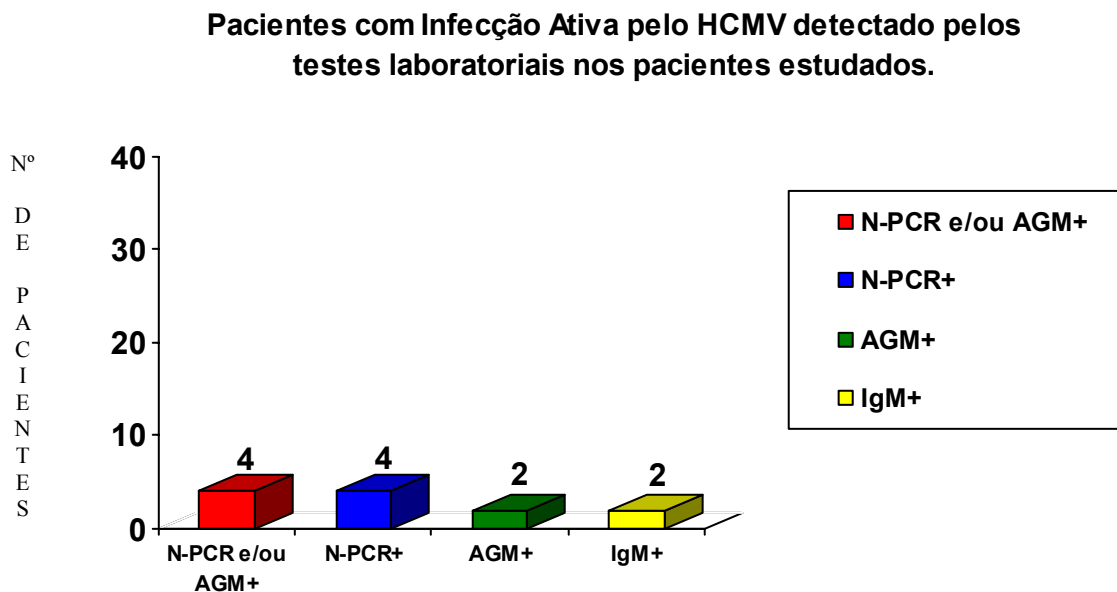
A infecção ativa pelo HCMV foi detectada por N-PCR e/ou antigenemia em 4/40 (10%) pacientes estudados; 4/40 (10%) pacientes, tiveram pelo menos 2 resultados de PCR positivos consecutivos; 2/40 (5%) pacientes, tiveram pelo menos 1 célula antígeno *pp-65* positivas. Em 2/40 (5%) pacientes (5%) a sorologia IgM-HCMV foi positiva (ELISA), porém, a N-PCR e a AGM foram negativas. Todos os pacientes apresentaram sorologias IgG-HCMV positivas,

detectadas por ELISA. Entre os pacientes com infecção ativa pelo HCMV, 2/4 (50%) apresentaram sintomas de doença por HCMV. (Tabela 4 e Gráfico 1)

**Tabela 10- Resultados dos testes de monitorização laboratorial de infecção ativa por HCMV nos pacientes com LES.**

	N	(%)
Infecção ativa por HCMV detectada por N-PCR e/ou Antigenemia (%)	4/40	10%
Infecção ativa por HCMV detectada por N-PCR (%), (2 ou mais amostras positivas consecutivas)	4/40	10%
Infecção ativa por HCMV detectada por antigenemia (1 ou mais células antígeno positivas) (%)	2/40	5%
Sintomas de Doença por HCMV (%)	2/40	5%

**Gráfico 1 – Resultados dos testes de monitorização laboratorial em relação à infecção ativa pelo HCMV.**





## 5.5 Descrição dos Casos de Pacientes que Apresentaram Infecção Ativa pelo HCMV

Nos pacientes com infecção ativa pelo HCMV detectados por N-PCR e/ou AGM, os achados clínicos e laboratoriais estão apresentados na Tabela 10.

**Tabela 11– Achados clínico-laboratoriais dos pacientes estudados que apresentaram Infecção Ativa pelo HCMV e \*IgM-HCMV reagente.**

<i>Paciente</i>	<i>N-PCR</i>	<i>AGM</i>	<i>IgM-HCMV</i>	<i>SLEDAI</i>	<i>Sintomas HCMV</i>	<i>ÓBITO</i>
12	<b>Sim</b>	Não	Não	<b>Ativo</b>	S/sintomas	Não
14	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	Não	<b>Ativo</b>	Febre	Não
19	<b>Sim</b>	Não	Não	Não Ativo	S/sintomas	Não
20	Não	Não	<b>Sim</b>	<b>Ativo</b>	S/sintomas	Não
25	Não	Não	<b>Sim</b>	Não Ativo	S/sintomas	Não
27	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	Não	<b>Ativo</b>	Febre	<b>Sim</b>

\*IgM-HCMV reagente não foi considerado Infecção ativa pelo HCMV.

Relatamos abaixo os casos dos pacientes que apresentaram infecção ativa pelo HCMV:

1) **Paciente 12/ MJBS/ FEM/ 29 anos/ branca/ viva:** Portadora de Lúpus Eritematoso Sistêmico, tendo como critérios de classificação serosite, *rash* cutâneo, FAN+, AADNA e artrite. Apresentava vasculite do sistema nervoso central. Consta com o SLEDAI em atividade com pontuação 8. Apresentou infecção do trato urinário e melhorou com antibióticoterapia. Foi atendida no ambulatório, referindo fraqueza e cansaço aos pequenos esforços, sensação de tontura e escurecimento da vista ao se levantar rapidamente, dispnéia e úlceras nas pernas e nas mãos. Os exames laboratoriais encontravam-se todos normais. Em relação à infecção ativa pelo HCMV, apresentou dois resultados de N-PCR

positivas consecutivas. Fez uso de Prednisona. A paciente não apresentou nenhum sintoma relacionados ao HCMV e não fez uso de Ganciclovir. 50 mg.

2) **Paciente 14/SRGS/FEM/45 anos/viva:** Portadora de Lúpus Eritematoso Sistêmico há 8 anos, tendo como critérios de classificação FAN+, AADNA+, nefrite, serosite. Presença de alterações hematológicas: hemoglobina - 8,00g/dl, hematócrito - 25,7% e número total de eritrócitos -  $2,75 \times 10^6 / \text{mm}^3$ . Ao exame de urina apresentou proteinúria, hematúria, cilindros; fez CFO em 2003/2004, Azatioprina 2004 a outubro de 2006, edema, fotossensibilidade, complementos baixos, C3 (0,47g/l) e C4 (0,03g/l). Foi internada apresentando edema de membros inferiores até a panturrilha e edema de face intenso há 15 dias, febre, vômitos e diarreia. A paciente encontrava-se com LES em atividade (SLEDAI 12). Apresentou infecção ativa pelo HCMV com duas amostras de PCR positivas e antigenemia consecutivas. Apresentou sintomas relacionados com a doença pelo HCMV, tais como: febre, diarreia, dor abdominal, vômitos. Recebeu como antiviral o Ganciclovir para HCMV e para tratamento do LES, pulso de ciclofosfamida e metilprednisolona. Melhorou após o tratamento.

3) **Paciente 19/ IR/ viva:** Portadora de Lúpus Eritematoso Sistêmico, tendo como critérios de classificação artrite, FAN+, Lúpus discóide, nefrite lúpica grau IV e anemia. A paciente **não se encontrava em atividade em relação ao SLEDAI**. Apresentou hemograma normal e o exame de urina apresentava, proteinúria, hematúria, piúria, cilindros. A urocultura era positiva e respondeu bem à antibioticoterapia. Foi atendida no ambulatório com aparecimento de lesões avermelhadas e dolorosas nas mãos. Dor mecânica em articulações de tornozelos direito e esquerdo sem sinais de inflamação. Apresentou infecção ativa pelo HCMV, com duas amostras de PCR positivas consecutivas. Não fez uso de antiviral. Faz tratamento de imunossupressão com Prednisona 20mg. A paciente também utiliza suplementos vitamínicos e sais minerais além de fazer uso de ácido-acetil-salicílico 100mg. Não apresentou sintomas relacionados ao HCMV.

4) **Paciente 20/MPP/ viva:** Portadora de Lúpus Eritematoso Sistêmico (SLEDAI 8), tendo como critérios de classificação nefrite, FAN+, artrite, leucopenia. Também apresentou hipertensão arterial sistêmica e obesidade. Infecção ativa pelo HCMV ocorreu com a presença de duas amostras de N-PCR positivas consecutivas. Utilizou Prednisona, Azatioprina, Ranitidina, Losartan. Não apresentou nenhum sintoma referente ao HCMV.

5) **Paciente 25/BFSS/ vivo:** Portador de Lúpus Eritematoso Sistêmico sem atividade (SLEDAI 0). Apresentou sorologia IgM para HCMV reagente e nenhum sintoma relacionado ao HCMV.

6) **Paciente 27/LRM/ óbito:** Portadora de Lúpus Eritematoso sistêmico, SLEDAI 10, deu entrada na enfermaria apresentando poliserosite, poliartrite, pancitopenia, fotossensibilidade, AADNA+, FAN+, úlceras orais, precisando ser entubada por insuficiência respiratória, dispnéica, descorada. Foi internada com edema generalizado, taquipnéia, febre. Recebeu prednisona 100mg, metilprednisona e ciclofosfamida e noroadrenalina. Apresentou 3 células positivas para antigenemia e três N-PCR positivas consecutivas para HCMV. Aos exames laboratoriais o hemograma mostrou anemia, VHS elevado, C3 e C4 baixos, proteinúria, hematúria, hemocultura negativo. Evoluiu para óbito por sepse de foco pulmonar e insuficiência de múltiplos órgãos. Apresentou doença pulmonar e provável óbito pelo Citomegalovírus.

## **5.6 FATORES DE RISCO PARA DESENVOLVIMENTO DE DOENÇA POR CITOMEGALOVÍRUS**

Os pacientes que desenvolveram infecção ativa pelo Citomegalovírus apresentaram durante o estudo um ou mais fatores de risco para o desenvolvimento de doença por HCMV (Tabela 11).

**Tabela 12 - Pacientes e prováveis fatores de riscos para doença por HCMV.**

<b>Fator de risco</b>	<b>Paciente 12</b>	<b>Paciente 14*</b>	<b>Paciente 19</b>	<b>Paciente 27**</b>
Corticóide	Prednisona 50mg	Prednisona (40mg)	Prednisona (20mg)	Prednisona (40mg)
Imunossupressor	-	Azatioprina (50mg)	Não	Azatioprina (50mg)
SLEDAI	8	<b>12</b>	0	<b>10</b>
N-PCR(HCMV)	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>
AGM (HCMV)	Negativo	<b>Positivo</b>	Negativo	<b>Positivo</b>

\* provável doença por HCMV; \*\* provável doença e óbito por HCMV

### **5.7 CAUSAS DE PROVÁVEL DOENÇA POR HCMV**

Observamos que em dois pacientes acompanhados no estudo que apresentaram nos testes diagnósticos N-PCR positivas consecutivas e/ou antigenemia positivas. Apresentando assim infecção ativa pelo HCMV, apresentaram também sintomas compatíveis com HCMV. Uma paciente apresentou sintomas tais como: febre, acometimento pulmonar e evoluiu á óbito. E outra paciente apresentou febre, diarréia, vômitos, dores abdominais. Na tabela 12 representamos as características desses pacientes.

**Tabela 13 - CAUSA DE PROVÁVEL DOENÇA PELO HCMV**

<b>Pct</b>	<b>idade</b>	<b>Sexo</b>	<b>SLEDAI</b>	<b>Infecção Ativa P/ HCMV</b>	<b>Sintomas</b>	<b>Doença por HCMV</b>	<b>Óbito</b>	<b>GANCI-CLOVIR</b>
14	45	F	12	<b>SIM</b>	Febre, Vômitos, diarréia, dores abdominais.	TGI	Não	<b>SIM</b>
27	30	F	10	<b>SIM</b>	Febre, infiltrado pulmonar.	Pulmão	<b>SIM</b>	<b>SIM</b>

## 5.8 CAUSA DOS ÓBITOS OCORRIDOS NOS PACIENTES DURANTE O SEGUIMENTO

Durante a monitorização dos pacientes estudados, 2 óbitos ocorreram. (Tabela 13):

**Tabela 14 – Causa dos óbitos ocorridos nos pacientes durante o estudo.**

<i>Paciente</i>	<i>SLEDAI</i>	<i>Infecção ativa pelo HCMV</i>	<i>Causas do Óbito</i>
<b>27</b>	<b>10</b>	<b>Sim</b>	<b>INFECÇÃO PULMONAR/ HCMV?</b>
35	6	NÃO	Insuficiência múltipla dos órgãos/ sepse de foco pulmonar.

## *Discussão*

## 6. DISCUSSÃO

O Citomegalovírus humano (HCMV) é um vírus da família *Herpesviridae* cuja principal característica é a capacidade de permanecer latente por longos períodos no organismo infectado e reativar-se em condições em que a imunidade do indivíduo fique comprometida. Em pacientes com doenças reumáticas, principalmente com lúpus eritematoso sistêmico (LES), que fazem uso de medicamentos imunossupressores para tratamento da doença de base, o citomegalovírus pode reativa-se e causar doença (TAKIZAWA *et al*, 2008).

Este importante vírus foi muitas vezes ignorado no campo das doenças reumáticas e não é muito familiar para os reumatologistas, mesmo sabendo que os tratamentos para a doença de base deixam os pacientes susceptíveis às infecções oportunistas (WASKO, 2004; WATTS, 2003; KANG & PARK, 2003).

Poucos estudos têm sido publicados sobre a doença lúpus e a infecção ativa pelo citomegalovírus (HRYCEK *et al*, 2005; YODA *et al*, 2006; MORI *et al*, 2004), e a maioria deles são relatos de casos (TAKIZAWA *et al*, 2008; TNANI *et al*, 2008; KWON *et al*, 2008).

Neste estudo, utilizamos a combinação de dois métodos de diagnóstico precoce e específico para a monitorização da infecção ativa pelo HCMV em pacientes com LES em seguimento na Disciplina de Reumatologia do Departamento de Clínica Médica – FCM/UNICAMP: a antigenemia e a Nested-PCR. Portanto, um diagnóstico diferencial é importante nestes casos em que os sintomas causados pelos vírus são muito similares aos sintomas causados pela própria doença do lúpus (NAWATA *et al*, 2001).

A técnica da antigenemia tem sido muito utilizada desde os anos 90, onde foi extensivamente estudada e considerada como marcador preditivo para desenvolvimento da doença por HCMV e, portanto, ferramenta indispensável para o início da terapia antiviral precoce (“preemptiva”). Sua eficácia tem sido comprovada em muitos estudos com pacientes transplantados e com AIDS (BOECK & BOIVIN, 1998; GERNA *et al*, 1991; REVELLO, *et al*, 1992; DODT *et al*, 1997; TAKIZAWA, *et al*, 2008).

As manifestações de infecções virais podem se assemelhar com os sintomas do LES e alguns podem agir como fatores patogênicos para esta doença, por isso um diagnóstico diferencial preciso é necessário (SCHATTNER *et al*, 1994; RAVEL *et al*, 1995; NAWATA *et al*, 2001). Detectando a infecção ativa pelo HCMV nestes pacientes podemos verificar as manifestações clínicas e os fatores de risco para doença por HCMV. Para prevenir infecções é importante otimizar o tratamento pelo uso da dose mínima da droga para poder controlar a doença e direcionar a terapia de acordo com a gravidade da doença e condição geral do paciente (DORIA *et al*, 2008; SARZI-PUTTINI *et al*, 2005).

Em nosso estudo, apesar de não termos realizado a monitorização da infecção ativa por HCMV durante um período longo de tempo, realizamos em média, duas coletas por paciente, que se encontravam em diversas etapas de atividade da doença lúpus. Obtivemos, mesmo assim, como resultado, 4/40 (10%) dos pacientes com infecção ativa pelo HCMV. Porém em um intervalo de tempo maior de seguimento desses pacientes a porcentagem pode ser maior.

Todos os pacientes realizaram sorologia IgG anti-HCMV e todos foram positivos, demonstrando que a soroprevalência do HCMV é muito alto nos pacientes com lúpus, como em outros pacientes imunossuprimidos (BONON *et al*, 2005; COSTA *et al*, 1999).

Dois pacientes do nosso estudo apresentaram IgM-HCMV positivas detectadas por sorologia tipo ELISA. Todos eles tinham altos níveis de anticorpos IgG-HCMV ( $\geq 180$  UI/ml). Altos níveis de IgG e IgM positivos podem significar reativação do HCMV, porém, neste trabalho não consideramos como critério para definir infecção ativa. Todos os casos de reativação de HCMV estavam em tratamento com esteróides e outros imunossupressores o que pode contribuir para reativação do HCMV (BRUGGEMANN, 1993; YODA *et al*, 2006).

Em um estudo realizado por Cannavan e colaboradores, em 1998, relataram que existe a ocorrência de uma sorologia IgM-HCMV falso-positiva, devido à presença de autoanticorpos (CANNAVAN, *et al*, 1998). Em um outro estudo realizado por Bartel e colaboradores, o mesmo descreve a reação cruzada que ocorre devido à elevação de títulos de anticorpos de uma série de vírus, tais



como: rubéola, parainfluenza tipos 1, 2, e 3, retrovírus tipo 2 e Epstein-Barr que tem sido relatados em Lúpus Eritematoso Sistêmico e podem agir na ativação não-específica dos linfócitos B (HOLLINGER *et al*, 1971; PHILIPS *et al*, 1970; ROTHFIELD *et al*, 1973). Para minimizar o problema de resultados falso positivos pela sorologia, ensaios alternativos demonstram ser eficazes, em especial a N-PCR, que tem alta sensibilidade na detecção do DNA-HCMV (CANNAVAN, *et al*, 1998).

Nosso estudo demonstrou que a infecção ativa ocorreu em 4/40 (10%) dos pacientes, onde todos os 4 tiveram infecção ativa pelo HCMV detectada pela N-PCR em duas ou mais amostras positivas consecutivas, mas somente em 2/40 (5%) a antigenemia foi positiva, com 1 ou mais células antígeno-positivas.

Changpin e colaboradores, em seu estudo sobre citomegalovírus em crianças com LES, detectaram infecção ativa pelo HCMV em 23,8% dos pacientes utilizando a antigenemia *pp65* (CHANGPIN *et al*, 2001).

Dois pacientes com infecção ativa pelo HCMV, tiveram sintomas compatíveis com doença pelo HCMV. Estes foram os dois únicos pacientes que tiveram infecção ativa detectada pela antigenemia. Um paciente teve febre e acometimento pulmonar e outro teve febre, dores abdominais e diarreia.

Em um estudo realizado por Costallat e colaboradores, em 1996, demonstrou que a hemorragia pulmonar é rara no lúpus, mas quase sempre fatal. Porém o diagnóstico de hemorragia pulmonar pode ser difícil porque as manifestações clínicas são semelhantes às das complicações infecciosas. Dispneia, tosse, hemoptise, dor torácica, febre, hipóxia e presença de infiltrado alvéolo-intersticial ao exame radiográfico podem ocorrer em ambas as condições. Broncoscopia é procedimento fundamental para se confirmar ou afastar a presença de infecção concomitante. Outros testes laboratoriais para confirmar ou afastar infecção ativa pelo HCMV também se faz necessário para o diagnóstico, sendo que as manifestações clínicas são parecidas. (COSTALLAT *et al*, 1996).

A mortalidade no LES é ainda considerável, a despeito do aumento linear de sua sobrevida. A maioria dos trabalhos tem colocado as infecções como causas de óbito mais freqüentes em pacientes com LES nas últimas décadas. A

presença de doença lúpica ativa e o uso de corticosteróides têm mostrado associação com a ocorrência de infecção (COSTALLAT *et al*, 1993; DORIA *et al*, 2008).

Em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), as causas infecciosas incluindo a infecção pelo citomegalovírus é uma das principais causas de morte nestes pacientes, superando até mesmo a mortalidade causada pela atividade da própria doença (SARZI-PUTTINI *et al*, 2005).

Nosso estudo mostrou que 2/4 (50%) pacientes com infecção ativa pelo HCMV, apresentaram provável doença por HCMV, sendo 1/2 (50%) foi à óbito por provável doença por HCMV. Porém, estes casos de doença na foram comprovados através de exames histopatológicos e não foi realizada necropsia no caso que evoluiu para o óbito.

Em outro estudo realizado por Costallat e colaboradores, em 1997, foram analisadas as causas de óbito de 55 pacientes com LES entre um período de fevereiro de 1973 a fevereiro de 1996, onde 17 pacientes haviam sido submetidos à necropsia. Os resultados obtidos foram que em 29/55 (52,7%) pacientes, o óbito foi devido a causa infecciosa. Entre esses pacientes, 2/29 (3,6%) foram a óbito por pneumonia causada pelo citomegalovírus (COSTALLAT *et al*, 1997).

A identificação dos pacientes com infecção ativa pelo HCMV foi um marcador precoce para selecionar pacientes com alto risco de desenvolver doença por HCMV, e também óbito por HCMV. Esta possibilidade permite um melhor prognóstico no tratamento do LES em relação às complicações que poderiam ser causadas pelo HCMV, inclusive, com este diagnóstico, foi possível distinguir os sintomas de HCMV da doença lúpica (YOON *et al*, 2002; BARZILAI *et al*, 2007).

Sugerimos com este trabalho, que apesar da baixa frequência da ocorrência da infecção ativa pelo HCMV nos pacientes com doenças reumáticas, principalmente o LES, que são tratados com altas doses de corticosteróides incluindo pulsos de metilprednisolona e/ou imunossupressores, é importante que seja realizado um diagnóstico diferencial da doença lúpica das infecções oportunistas, principalmente o HCMV.

O intenso tratamento imunossupressor para os sintomas da doença de base pode deixar os pacientes mais susceptíveis a outras infecções graves. Observamos entre os pacientes estudados nesta casuística alguns fatores de risco para desenvolvimento de doença pelo HCMV: infecção ativa pelo HCMV, uso de corticóides e imunossupressores em doses elevadas e a presença de doença lúpica ativa, que deverão ser considerados além da soropositividade IgG. Verificamos também, que as técnicas de N-PCR e antigenemia foram sensíveis e específicas em determinar quais os pacientes com infecção ativa pelo HCMV, porém, o teste da antigenemia demonstrou um ótimo valor preditivo positivo para doença por HCMV, pois detectou somente estes casos.

## ***Conclusão***

Diante dos resultados apresentados no presente estudo, obtivemos as seguintes conclusões:

- Detectamos a presença do DNA do HCMV em 4/40 (10%) pacientes e a presença do antígeno *pp65* do Citomegalovírus em 2/40 (5%) pacientes estudados em amostras de sangue de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico;
- Verificamos a presença das imunoglobulinas G e M anti-HCMV em 40/40 (100%) e 2/40 (5%) através do teste sorológico tipo ELISA nos pacientes estudados;
- Verificamos o impacto clínico causado pela infecção ativa e doença por HCMV nos pacientes com lúpus dessa casuística, sendo que 2/4 (50%) dos pacientes com infecção ativa por HCMV detectados com antigenemia e/ou PCR tiveram doença por HCMV e um deles foi à óbito por doença compatível por HCMV.

A detecção precoce da infecção ativa pelo HCMV é de extrema importância nos pacientes desta casuística para um uso mais cuidadoso de imunossupressores e terapia antiviral específica.

## *Referências Bibliográficas*

Almeida LNB, Azevedo RS, Amaku M, Massad E. Cytomegalovirus seroepidemiology in an urban community of São Paulo, Brazil. **Rev Saúde Pública**; 2001, 35(2): 124-129.

Alarcon GS & Lowe JK. Of ethnicity race and lupus. **Lupus** 10: 2001, 594-596.

Alarcon GS; Friedman AW; Straaton KV, et al. Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups: III. A comparison of characteristics early in the natural history of the LUMINA cohort. Lupus Minority populations: Nature vs Nurture. **Lupus** 1999: 8, 197-209.

Alberola J, Dominguez V, Cardenoso L, Lopez-Aldeguer J, Blanes M, Estelles F, Ricart C, Pastor A, Igual R, Navarro D. Antibody Response to Human Cytomegalovirus (HCMV) Glycoprotein B (gB) in AIDS Patients with HCMV End-Organ Disease. **J Medical Virology**, 1998, 55: 272-280.

Albuquerque DM, Costa SCB – Genotyping of Human Cytomegalovirus Using Non-Radioactive Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analysis. **J Virol**, 2003, 110: 25-28.

Appleman MD; Causev DM; Leedom JM; Amheim N. Detection of cytomegalovirus DNA in peripheral blood of patients infected with Human deficiency virus. **J.infect. Dis.** 1988, 158: 1185- 1192.

Aquino VH, Figueiredo LTM. High prevalence of renal transplant recipients infected with more than one cytomegalovirus glycoprotein B genotype. **J Med Virol**, 2000, 61 (1): 138-142.

Augustynowics E, Dzierzanowska D. Molecular Analysis of the Human Cytomegalovirus Strains Isolated from Infected Infants. **Acta Microbiologica Polonica**, 1998, 47(4): 373-383.

Ayasha DCG; Costa IP. Alterações da personalidade no lúpus eritematoso sistêmico. **Rev Bras Reumatol** 2005, Vol. 45, N.5, Sep./Oct.

BEZERRA, E. L. M., VILAR, M. J. P., BARBOSA, O F. C., ET AL: Lúpus eritematoso sistêmico (LES): Perfil clínico laboratorial dos pacientes do hospital universitário onofre lopes (ufrn- natal/ brasil) e índice de dano nos pacientes com diagnóstico recente. **REV Bras. Reumatol.** 2005, 45 (06): 339-342.

Bhopal R. Is research into ethnicity and health racist, unsound, or important science? **Br Med J**, 1997 **314**: 1751-1756.

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.** 2003, 25(01). São José do Rio Preto.

Boeckh M, Bowden RA, Goosrich JM, Pettinger M, Meyers JD Cytomegalovirus Antigen detection in peripheral blood leukocytes after allogenic marrow transplantation. **Blood.** 1992; 80 (5): 1358 – 1364.



Boekh M; Bowden RA; Gooley T; Myerson D, Corey L. Successful modification of a pp65 antigenemia-based treatment strategy for prevention of CMV disease in allogeneic marrow transplant recipients. **Blood** 1999, 93: 1781-1782.

Boeckh M; Boivin G. Quantification of cytomegalovirus methodologic aspects and clinical applications. **Clin Microbiol Rev** 1998; 11: 533-4.

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.

Bonfá ESDO; Borba Neto EFB: Lúpus Eritematoso Sistêmico. In: BONFÁ E. S. D. O, Ioshinari N H: Reumatologia para o clínico. Editora Roca, São Paulo, p.25-33, 2000.

Bongarts A, von Laer D, Vogelberg C, Ebert K, van Lunzen J, Garweg J, Vaith P, Hufert F, Haller O, Meyer-Konig U. Glycoprotein B Genotype of Human Cytomegalovirus: Distribution in HIV -Infected Patients. **Scan J Inf Dis**, 1996, 28: 447-449.

Bonon SHA; Rossi CL; De Souza CA; *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. S. Paulo.** 2006, 48 (5): 275-278, september- october.

Bonon SHA; MENONI, Silvia Mendonça Ferreira ; ROSSI, C.L. ; SOUZA, Cármino Antonio de ; COSTA, D. B. ; COSTA, Sandra Cecília Botelho . Surveillance of cytomegalovirus infection in haematopoietic stem cell transplantation patients. **J Infectol.** 2005; 50:130-137.

Britt WJ, Mach M. Human Cytomegalovirus Glycoproteins. **Intervirology**, 1996, 39 (5,6): 401-412.

Bruggman CA. Cytomegalovirus and latency: an overview *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 1996, 64: 325-333.

Cameron JS. Lupus nephritis. **J Am Soc Nephrol**, 10: 1999, 413-424.

Cannavan FPS; Costallat LTL; Bértolo MB; *et al.* False positive IgM antibody tests for human cytomegalovirus (HCMV) in patients with SLE. **Lupus**. 1998, 7: 61-62.

Changpin Z; Kunling S; Zaifang J *et al.* Early diagnosis and monitoring of active HCMV infection in children with systemic lupus erythematosus. **Chinese Med J** 2001; 114: 1309-1312.

Cohen J; Corey R. Cytomegalovirus infection in the normal host. **Medicine**. 1985, 64: 100-114.

Coimbra AMV Valor propedêutico dos aspectos clínicos, laboratoriais e dos índices radiológicos no estudo da osteoporose. Tese de doutoramento apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, 1991.

Coimbra, IB: Estudo da Fertilidade em pacientes lúpicas. Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP para a obtenção do título de Mestre, 1993.

Costa SCB – Infecção por Citomegalovírus (CMV): Epidemiologia, Diagnóstico e Tratamento. **Ver. Brás. Clín. Terap.**, 1999, 25(1): 18-28.

Costa SCB. Infecção por citomegalovírus (CMV): epidemiologia, diagnóstico e tratamento. **Rev. Brás. Clín. Terap.** 1999, 25 (1): 18-28.

Costa SCB; Miranda SRP; Alves G; *et al.* Detection of cytomegalovirus infection by PCR in renal transplant patients. **Bras J Med Biol Res.** 1999, 32: 953-959.

Costa SCB; Miranda SRP; Rossi, *et al.* Donated organs as a source of cytomegalovirus (CMV) in renal transplant patients. **Brazilian Journal medical biology res.** 1994, 27: 2573-2578.

Costallat LTL & Coimbra AMV. Lúpus eritematoso sistêmico: análise clínica e laboratorial de 272 pacientes em um hospital universitário (1973 - 1992). **Rev Brás Reumatol**, 1995 **35**:23-29.

Costallat LTL Contribuição ao estudo do LES. Análise clínica e laboratorial de 272 casos (1973-1992). Tese-livre docência - Faculdade de Ciências Médicas UNICAMP, Campinas, 1992.

Costallat LTL; Cardoso EFV; Freire ALF; *et al.* Hemorragia pulmonar no lúpus eritematoso sistêmico: sucesso terapêutico com “pulses” de metilprednisolona. Relato de caso e revisão da literatura. **Rev Bras Reumatol** 1996; 36: 93-96.

Cour Boveda I; Kannan Kannan A; Avarez Laufuente R; *et al.* A case of pneumonia by cytomegalovirus in a patient with acute myeloid leukemia. **An Med Intern.** 1999, May: 16(5): 247-248.

Chang M; Pan MR; Chen DY, *et al.* Human Cytomegalovirus pp65 lower matrix protein: a humoral immunogen for systemic lupus erithematosus patients and autoantibody accelerator for NZB/W F1 mice. **Clin Exper Immunol** 2005, 143: 167-169.

Chou S – Differentiation of Cytomegalovirus Strains by Restricion Analysis of DNA Sequences Amplified from Clinical Specimens. **J Infect Dis**, 162: 738-42, 1990.

Chou S, Dennison KM. Analysis of Interstrain Variatiol1 in Cytomegalocirus Glycoprotein B Sequences Encoding Neutralization-Related Epitopes. **J Infect Dis**, 1991, 1229-1234.

Chou S. Differentiation of cytomegalovirus strains by restriction analysis of DNA sequences amplified from clinical specimes. **J. Infect. Dis.** 1990, 162: 738-742.

D.J.; HAHN, B. H., **Dubois' Lupus erythematosus.** 1997: Fifth ed, Baltimore, Ed. Willians & Wilkins, HOEKMAN, K.; VAN NIEUWKOOP, 49-65.

Demmler GJ; Buffone GJ; Schimbor CM; May RA. Detection pf cytomegalovirus in urine from newborns by using Polymerase Chain Reaction DNA amplification. **J. Infect. Dis.** 1988, 158: 1177-1184.

Denman AM. SLE is a viral aetiology a credible hypothesis? **J. Infection**. 2000, 40: 229-233.

Dodt KK; Jacobsen PH; Hofmann B et al. Development of cytomegalovirus (CMV) disease may be predicted in HIV-infected patients by CMV polymerase chain reaction and antigenemia tests. **AIDS** 1997; 11: F21-8.

Doria A; Arieti S; Rampudda M; et al. Preventive strategies in systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity Rev** 2008; 7: 192-97.

Drago F, Aragone MG, Lugani C, Reborá A. Cytomegalovirus Infection in Normal and Immunocompromised Humans. **Dermatology**, 2000, 200: 189-195.

Dubois EL; Wallace DL: Clinical and laboratory manifestation of systemic lupus erythematosus. In Dubois EL, Wallace DL: *Lupus erythematosus*, 3<sup>rd</sup> ed, Philadelphia, Lea & Febiger, p.317-449, 1987.

Epps RE; Pittelkow MR; Su DWP: TORCH syndrome. **Semin Dermatol**; 1995, 14: 179-186.

Eroglu GE. & Kohler PF. Familial systemic lupus erythematosus: the role of erythematosus in three ethnic groups: III. A comparison of characteristics early in the natural history of the LUMINA cohort. *Lupus Minority populations: Nature & Nature*.

Fernandes SRM; Persoli LB; Marquel SBD; Costallat LTL. HLA antigens and susceptibility to Sistemic Lupus erythematosus in Brazilian patients. **Rev Bras Reumatol**, 1998 **38 (6)**: 332-336.

Fessel EJ. Systemic lupus erythematosus in the community. Incidence, prevalence, outcome, and first symptoms; the high prevalence in black women. **Arch Intern Med**, 1974 **134**: 1027-1035.

Fries BC, Chou S, Boeckh M, Torok-Storb B – Frequency Distribution of Cytomegalovirus Envelope Glycoprotein Genotypes in Bone Marrow Transplant Recipients. **J Infect Dis**, 1994, 169: 769-774.

Fustinoni O. & Biller J. Ethnicity and stroke: beware of the fallacies. **Stroke**, genetic and environmental factors. **Ann Rheum Dis**, 2002, **61**: 29-31.

Gerna G; Zipeto D; Parea M et al. Monitoring of human cytomegalovirus infections and ganciclovir treatment in heart transplant recipients by determination of viremia, antigenemia, and DNAemia. **J Infect Dis** 1991; 164: 488-98.

Gladman D.D. & Urowitz MB. S.L.E. Clinical features, Klippel JH. & Dieppe PA **Rheumatology**, 1998 second edition, London, Ed Mosby 7: 1.1 – 1.18.

Gladman DD. & Urowitz MB. Systemic lupus erythematosus: Clinical features. cap 2 in: John H. Klippel & Paul Dieppe. **Rheumatology** 1994, first edition London Mosby, 6, 2.1-3.12.

Grundy JE. Virologic and pathogenetic aspects of cytomegalovirus infection. **Rev Infect Dis** 1990, 12(Suppl 7): 711-719.

Hayashi T; Lee S; Ogasawara H; *et al.* Exacerbation of systemic lupus erythematosus related to cytomegalovirus infection. **Lupus** 1998, 7: 561-564.

Hebart H, Greif M, Krause H, Kanz L, Jahn G, Müller CA, Einsele H – Interstrain Variation of Immediate Early DNA Sequences and Glycoprotein B Genotypes in Cytomegalovirus Clinical Isolates. **Med Microbiol Immunol**, 1997, 186: 135-138.

Hellmann DB, Petri M, Whiting-O' Keef. Q: Fatal infections in systemic lupus erythematosus: the role of opportunistic organisms. **Medicine** 1987, 66: 341-348.

**HEMATOLOGY/ ONCOLOGY OF NORTH AMERICA VOL.7 (1) 293-315;1993.**

Hilário MOE; Pedrizzi MS; Goldenberg J; Sato IE; Naspitz C; Sato EI; Ferraz MB; Lourenzi VPM; Natour J; Ikedo F; Atra E. Estudo da reprodutibilidade do índice de atividade do LES. **Rev Bras Reumatol** , 1991 **31**: 133-136.

Ho M. Cytomegalovirus: Biology and Infection, 2.ed. New York, Plenum Publishing Corporation: 1-440, 1991.

Hochberg MC The epidemiology of systemic lupus erythematosus. In WALLACE, Hochberg MC. The epidemiology of systemic lupus erythematosus. cap 4 Daniel J. Wallace, Bevra Hannahs Hahn **Dubois, Lupus Erythematosus** 1993, Fourth edition Philadelphia Lea & Febiger, 49-57.

Hocheberg MC; Perlmutter DL; Medsger, TA; Steen, V; Weisman, MH; White B.; Wigley FM. Prevalence of self-reported physician-diagnosed systemic lupus erythematosus in the USA. **Lupus**, 1995 **4**: 454-56.

Holinger FB; Sharp JT; Lidsky MD; Rawls WE. Antibodies to viral antigens in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**. 1971, 14:1-11.

Horwitz CA; Henle G; *et al*: Clinical and laboratory evaluation of cytomegalus-induced mononucleosis in previously healthy individuals. **Medicine** 1986, 65: 124-134.

Hrycek A; Kusmierz D; Mazurek U; *et al*. Human Cytomegalovirus in patients with Systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity**, 2005, 38, 487- 491.

Huth EJ. Identifying ethnicity in medical papers. **Ann Intern Med**, 1995 **122**: 619-621.

Incidence of systemic lupus erythematosus in Birmingham. England. Relationship to Karlsson EW; Daltroy LH; Lew RA, *et al*. The relationship of socioeconomic status, race and modifiable risk factors to outcomes in patients with systemic. **Arthritis Rheum**, 1997,**40**: 47-56.

Jiwa NM, Van Gemert GW, Raap AK, Van Der Rijke FM, Mulder A, Lens PF, Salimans MMM, Zwaan FE, Van Dorp W, Van Der Ploeg M. Rapid detection of human cytomegalovirus DNA in peripheral blood leukocytes of viremic transplant recipients by the polymerase chain reaction. **Transplantation**. 1989; 48: 72 – 76.



Kang I, Quan T, Nolasco H, *et al.* Defective control of latent Epstein-Barr Virus infection in Systemic lupus erythematosus. **J Immunol.** 2004. 172: 1287-1294.

Kang I; Park SH. Infectious complications in SLE after immunosuppressive therapies. **Curr Opin Rheumatol** 2003; 15: 528-34.

Kasapcopur O, Ergul Y, Kutlug S, *et al.* Systemic lupus erythematosus due to Epstein- Barr vírus or Epstein-Barr vírus infection provoking acute exacerbation of systemic lupus erythematosus? **Rheumatol. Int.** 2006 26: 765-767.

Kashiwagi Y; Kawashima H; Sato S; *et al.* Virological and Immunological Characteristics of Fatal Virus-Associated Haemophagocytic Syndrome (VAHS). **Microbiol Immunol**, 2007, 51 (1), 53-62.

Katagiri A; Ando T; Kon T; *et al.* Cavitory lung lesion in a patient with lupus erythematosus: an unusual manifestation of cytomegalovirus pneumonitis. **Mod Rheumatol.** 2008.

Klippel J, Dieppe P: **Rheumatology**, 2<sup>nd</sup> ed. London, Mosby, 1998.

Kwon CM; Jung YW; Yun DY *et al.* A case of acute pericarditis with hemophagocytic syndrome cytomegalovirus infection and systemic lupus erythematosus. **Rheumatol Int** 2008; 28: 271-273.

Lahita RG. Clinical Presentation of S.L.E. KELLEY, W.N.; HARRIS, E.D.; RUDDY, S.; SLEDGE, C. B. **Textbook of Rheumatology**, 1997, fifth edition, Philadelphia. Ed. W. B. Saunders Company. 1028-1039.

Lasry S, Deny P, Asselo C, Rauzy M, Boucher J, Guyo TC, Leroux MC, Wartowski A, Reinert P, Nicolas JC. Interstrain Variations in the Cytomegalovirus (CMV) Glycoprotein B Gene Sequence among CMV-Infected Children Attending Six Day Care Centers. **J Infect Dis**, 1996, 174: 606-609.

LEC Occasional Series: lupus around the world systemic lupus erythematosus in São Marini R & Costallat LTL Lúpus eritematoso sistêmico juvenil: manifestações clínicas, laboratoriais e evolutivas em 59 pacientes. **Rev Bras Reumatol**, 1999 **29(5)**: 252-258.

Leshner JL. Cytomegalovirus infections and the skin. **J Am Acad Dermatol** 18: 1333-1338.

Liang MH; Socher SA; Roberts WN; Esdaile JM. Measurement of systemic lupus erythematosus activity in clinical research. **Arthritis Rheum**. 1988, Jul. 31(7): 817-825.

Ljungman P. And Plotkin SA. Workshop on CMV disease: Definitions, Clinical Severity Scores, and New Syndromes. Scand. **J. Infect. Dis**. 1995, Suppl. 99: 87-89.

Ljungman P. Prevention and treatment of viral infections in stem cell transplant recipients. **Bras. J. Haematol.** 2002, 118: 44-57.

Magalhaes MB; Donadi EA; Louzada Jr. P. Manifestações clínicas do lúpus eritematoso sistêmico: Abordagem diagnóstica e terapêutica na sala de urgência. **Medicine**, 2003: Ribeirão Preto, 36: 409-417, abril-dez.

Matos Carneiro, JR. Estudo clínico, randômico e duplo cego do uso do metrotexato em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico - Tese de Mestrado - Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1997.

Mckenzie K & Crowcroft N Style matters: ethnicity, culture, race, and culture: guidelines for research, audit, and publication. **Br Med J**, 1996 **312**: 1094.

Mckenzie KJ. & Crowcroft NS. Race, ethnicity, culture, and science. **Br Med J**, 1994 **309**: 286-287.

Mckenzie K. & Crowcroft N. Style matters: ethnicity, culture, race, and culture: guidelines for research, audit, and publication. **Br Med J**, 1996, **312**: 1094.

Mera JR; Whimbey E; Elting L; *et al.* Cytomegalovirus pneumonia in adult nontransplantation patients with cancer: review of 20 cases occurring from 1964 through 1990. **Clin. Infect. Dis.** 1996, Jun;22(6): 1046-1050.

Meyer-Konig D, Vogelberg C, Bongarts A, Kamp AD, Delbrück R, Wolff Vorbeck G, Kirste G, Haberland M, Huffert FT, von Laer D. Glycoprotein B Genotype

Correlates with Cell Tropism In Vivo of Human Cytomegalovirus Infection. **J Med Virol**, 1998, 55: 75-81.

Mori T; Kameda H; Ogawa H; *et al.* Incidence of Cytomegalovirus Reactivation in Patients with Inflammatory Connective Tissues Diseases Who Are Under Immunosuppressive Therapy. **J Rheumatol**, 2004: 31-37.

Myers JB, D Amsterdam. The laboratory diagnosis of cytomegalovirus infections. **Immunol. Invest.** 1997, 26(3), 383-394.

Nawata M; Seta N; Yamada M; *et al.* Possible triggering effect of cytomegalovirus infection on systemic lupus erythematosus. **Scand J. Rheumatology.** 2001, 30: 360- 362.

Nichols WG, Boekh M. Recent advances in the therapy and prevention of CMV infections. **J Clin Virology**, 2000, 16:25-40.

Pannuti CS – Infecção por Citomegalovírus. **Revista de Ensaaios Pediátricos** 1984, (São Paulo), 6: 144-153.

Pannuti CS, Vilasboas LS, Neto VA, Angelo MJO, Sabbaga E – Detecção de Anticorpos IgM nas Infecções Primárias e Secundárias pelo Citomegalovírus em Pacientes Submetidos a Transplante Renal. **Revista do Instituto de Medicina Tropical** 1987, (São Paulo), 29: 317-322.

Pannuti CS. Citomegalia. In: Ferreira, A. W.; Ávila, S.L.M. eds. Diagnóstico Laboratorial das principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes, 2<sup>a</sup> edição, Editora Guanabara Koogan, Cap. 5, p. 68-73, 2001.

Philips PE; Christian CL. Myxovirus antibody increases in human connective tissue disease. **Science**. 1970, 168: 982-984.

Ravel R: Infecções virais – CMV. In Ravel R: Laboratório Clínico. 6<sup>a</sup> ed. Guanabara Koogan, p. 254-257, 1995.

Retier C, Imbert BM, Da Vid G, Courcoux P, Hallet MM. A Polymorphism in the Major Immediate-Early Gene Delineates Groups Among Cytomegalovirus Clinical Isolates. **Virus Research**, 1998, 57: 43:51.

Revello MG; Percivalle E; DiMatteo A et al. Nuclear expression of the lower matrix protein of human cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes of immunocompromised viraemic patients. **J Gen Virol** 1992; 73: 437-42.

Rosner S, Ginsler E M, Diamond HS, *et al*: A multicenter study of outcome in systemic lupus erythematosus. II- Causes of death. **Arthritis Rheum**. 1982, 25: 612-617.

Rothfiels NF; Evand AS; Niedman JC. Clinical and laboratory aspects of raised virus antibody titers in systemic lupus erythematosus. **Ann Rheum Dis** 1973; 32: 238-246.

Rubin RH – Introduction to the Symposium. *Review of Infectious Diseases*, 12(Suppl.): 1990, 691-692.

Rus V, Hocheberg MC: The epidemiology of systemic lupus erythematosus. In: WALLACE, D. J., HAHN, B. H. *Dubois erythematosus*. 6 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p. 65-83, 2002.

Saiki RK et al. Primer – directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**. 1988; 239: 487 – 491.

Saiki RK; Scharf S; Faloona F; *et al.* Enzymatic amplification of globin genomic sequences and restriction site analyses for diagnosis of sickle-cell anemia. **Science**. 1990, 230.

Santos D D, Percegon L, Oliveira M E, Paredes I B, Skare T L Lupus eritematoso sistêmico e infecção por CMV: Descrição de casos: **Rev. Br. Reumatol**. 1998 Vol. 38- Nº 5 set/out.

Sarzi-Puttini P; Atzeni F; Iaccarino L ; et al. Environment and systemic lupus erythematosus: an overview: **Autoimmunity** 2005; 38: 465-72.

Sato E I; Bonfá ED; Costallat LTL; *et al.* Lúpus Eritematoso Sistêmico: Tratamento do Acometimento Cutâneo/ Articular. Projeto Diretrizes. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina, 2004.

Sato EI. Aspectos clínicos, laboratoriais e terapêuticos de 201 pacientes. Tese de livre docência apresentada à Escola Paulista de Medicina. São Paulo, 1994.

Sato, EI, Natour J; Martineli VPL; *et al.*: Seguimento clínico e laboratorial de 132 pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. **Rev. Bras. Reumatol.** 1991, 31: 57-62.

Scotton AS. Avaliação da densidade de neutrófilos em sangue periférico de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. Tese de mestrado apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina. São Paulo, 2000.

SCHATTNER A; STHOEGER, Z., GELTNER, D: Effect of cytomegalovirus infection on drug induced SLE. **Postgrad Med. J. N.** 1994, 70: 738-740.

Segal BH, Sneller MC: Infections complications of immunosuppressive therapy in patients with rheumatic diseases. **Rheum dis Clin. North Am** 1997, 23: 219-237.

Sekigawa I, Nawata M, Seta N, *et al.* Cytomegalovirus infection in patients with systemic lupus erythematosus. **Clin. Exp. Rheumatol.** 2002, N. 20, p. 559-564.

Sekigawa I, Ogasavara H, Kaneko, H, *et al.* Retroviruses and autoimmunity. **Intern. Med.** 2001, 40: 80-86.

Shepp DH, Match ME, Ashraf AB, Lipson SM, Millan C, Pergolizzi RG. Cytomegalovirus Glycoprotein B Groups Associated with Retinitis in AIDS. **J Infect Dis**, 1996, 174: 184-187.

Shepp DH, Match ME, Lipson SM, Pergolizzi RG. A Fifth Human Cytomegalovirus Glycoprotein B Genotype. **Research in Virology**, 1998, 149: 109-114.

SHIBATA D; MARTIN WJ, APPLEMAN MD, CAUSEY DM, LEEDOM JM, ARNHEIM N. Detection of Cytomegalovirus DNA in Peripheral Blood of Patients Infected with Human Deficiency Virus. **J Infect. Dis.**1988: 158: 1185 – 1192.

Souza LE, Nicholson D, Matthey S, Alden R, Haugen TH, Trigg ME, Bale JE. Rapid Epidemiologic Characterization of Cytomegalovirus Strains In Pediatric Bone Marrow Transplant Patients. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, 1995, 16: 399-404.

Stenberg RM; Thomsem DR; Stinski M F. Structural analysis of the major immediate early gene of human cytomegalovirus. **J. Virol.** 1984, 49(1): 190-199.

Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum** 1982, 25: 1271-1277.



Takizawa Y; Inkuma S; Tanaka Y; et al. Clinical characteristics of cytomegalovirus infection in rheumatic diseases: multicentre survey in a large patient population. **Rheumatol** 2008; 1-6.

Tanaka Y; Seo R; Nagai Y; et al. Systemic lupus erythematosus complicated by cytomegalovirus-induced hemophagocytic syndrome and pneumonia. **Japanese J Clin Immunol**. 2008, Vol. 31, N.1, p. 71-75.

Tegtmeier GE. Posttransfusion cytomegalovirus infections. **Arch Pathol Lab Med**; 1989, 113:236-245.

Tnani N; Massoumi A; Lotholary O et al. Management of cytomegalovirus infections in patients treated with immunosuppressive drugs for chronic inflammatory diseases. **La Revue de médecine interne** 29 2008: 305-310.

Torok-Storb B, Boeckh M, Hoy C, Leisenring W, Myerson D, Gooley T – Association of Specific Cytomegalovirus Genotypes with Death from Myelosuppression after Marrow Transplantation. **Blood**, 1997, 90(5): 2097-2102.

Toyoda H. Ido M; Hori H; et al. A case of juvenile myelomonocytic leukemia with concomitant cytomegalovirus infection. **J. Pediatr. Hematol Oncol**. 2004, Sep, 26(9): 606-608.

Van Der Bij W, Torensma R; Van Son WJ, Tegzess AM. THE T.H . Rapid immunodiagnosis of active cytomegalovirus infection by monoclonal antibody staining of blood leukocytes. **J Med Virol**. 1988; 25, 179 – 188.

Van Der Bij W, Van Son WJ, Van Der Berg APM, Tegzess AM, Torensma R. The T.H. Cytomegalovirus (CMV) Antigenemia : Rapid Diagnosis and Relationship with CMV – Associated Clinical Syndromes in Renal allograft recipients. **Transplant Proc** 1989; 21 (1): 2061 – 2064.

Vasquez V; Barzaga RA; Cunha BA. Cytomegalovirus induced flare of systemic lupus erythematosus. **Heart Lung**. 1992, N.21: 407-408.

Veronesi RDM DC. Citomegalia. Doenças Infecciosas e Parasitárias, 8ed: 206-211,1991.

Vilar MJ, Sato EI: Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal-Brazil). **Lupus** 2002,11: 528-532.

Vilmer C, Pérol Y. Manifestations cutanées des infections à cytomegalovirus. **Ann Dermatol Vénéréol**; 1984, 111: 119-125.

Volgelberg C, Meyer-Konig U, Hufert FT, Kirste G, von Laer D. Human Cytomegalovirus Glycoprotein B Genotypes in Renal Transplant Recipients. **J Med Virol**, 1996, 50: 31-34.

Wada K, Mizuno S, Kato K, Kamiya T, Ozawa K. Cytomegalovirus Glycoprotein B Sequence Variation among Japanese Bone Marrow Transplant Recipients. **Intervirolgy**, 1997, 40: 215-219.

Wallace DJ.; Hahn BH.; Quismorio FP. Duboi's Lupus erythematosus. London, Philadelphia: Leo & Febiger, 1993.

Wallace DJ. & Israe ML. It's not the same old lupus or sjögren's any more: one hundred new insights, approaches, and options since 1990. **Current Opin Rheumatol**, 1999 **11**: 321-329.

Wallace DJ. & Metzger AL. Systemic lupus erythematosus: clinical aspects and treatment cap 69 in: William J. Koopman. **Arthritis and Allied Conditions**, 1996.13th edition Philadelphia Williams & Wilkens, p 1319-45.

Wasko MC. Comorbidit conditions with rheumatic diseases: an update. **Curr Opin Rheumatol** 2004; 16: 109-13.

Watts RA, Scott DG. Epidemiology of the vasculitis. **Curr Opin Rheumatol** 2003; 15: 11-6.

Weller TH. The cytomegaloviruses: ubiquitous agents with protean clinical manifestations (First of two parts). **N. Engl. J. Med.** 1971, 285: 203-214.

Weller TH. The cytomegaloviruses: ubiquitous agents with protean clinical manifestations (Second of two parts). **N. Engl. J. Med.** 1971, 285: 267-274.

Wingart RZ, Brytting M, Linde A, Wahren R, Grillner L. Sequence Variation within Three Important Cytomegalovirus Gene Regions in Isolates from Four Different Patient Populations. **J Clin Microbiol**, 1998, 36(12): 3662-3669.

Yoda Y; Hanaoka R; Ide H; *et al.* Clinical evaluation of patients with inflammatory connective tissue diseases complicated by cytomegalovirus antigenemia. **Mod. Rheumatology**. 2006; 16: 137-142.

Yoon KH; Fong KY; Tambiah PA. Fatal cytomegalovirus infection in two patients with systemic lupus erythematosus undergoing intensive immunosuppressive therapy: role for cytomegalovirus vigilance and prophylaxis? **J Clin Rheumatol** 2002; 8(4): 217-22.

Yoshikawa T; Ihira M; Susuki K. *et al.* fatal acute myocardites in na infant with human herpesvirus 6 infection. **J. Clin. Pathol.** 2001, 54: 792-795.

Zhang C; Shen K; Jiang Z; He Xiaohu. Early diagnosis and monitoring of active HCMV infection in children with systemic lupus erythematosus. **Chin Medical J.** 2001, 114 (12): 1309- 1312.

*Anexos*

## Anexo 1: Sledai (Índice de atividade da doença Lúpus Eritematoso)

### Sistêmico

#### INFECÇÃO ATIVA PELO CITOMEGALOVÍRUS EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

MONITORIZAÇÃO LABORATORIAL DE INFECÇÃO ATIVA PELO CITOMEGALOVÍRUS

ESCALAS DE AVALIAÇÃO DE ESTÁGIO DA DOENÇA (LES)

<p>Nome:                  HC:                  DATA COLETA1:                  DATA COLETA2:                  ESTAGIO</p>	<p>SLEDAI:</p>
--	----------------

Peso	Descritor	Definição
8	<b>Convulsão</b>	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 uremias e 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 no 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 <b>início de AVC(s). Excluir causas por Arteriosclerose ou hipertensão.</b>
8	Vasculite	Ulceração, <b>gangrena, nódulos sensíveis nos dedos, infarto periungual, hemorragias puntiformes(splinter), ou biopsia ou exame de angiografia para vasculite.</b>

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	<b>Cilindros hemáticos ou hemegranulares.</b>
4	<b>Hematúria</b>	> 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	<b>&gt; que 5 glóbulos brancos/campo de alta potência. Excluir infecção.</b>
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	Ulcerações 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 38° C. Excluir causainfecciosa.
1	Trombocitopenia	< que 100.000 plaquetas/ mm <sup>3</sup>
1	Leucopenia	< que 3.000 glóbulos brancos/mm <sup>3</sup> . Excluir causas por drogas.

## Anexo 2: Termo de consentimento livre e esclarecido

# TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, \_\_\_\_\_

R.G. \_\_\_\_\_, aceito colaborar com o estudo “ **Infecção ativa por Citomegalovírus 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 citomegalovirus utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase e a Antigenemia. Para isso, sei que colherão 2 amostras de sangue com intervalo de até 1 mês, 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 pelo citomegalovirus. Estou ciente de que todos os dados colhidos serão sigilosos, e que meu nome não será colocado em qualquer publicação. A amostras serão armazenadas em freezer – 20 ° C, seguindo as normas da resolução N° 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: Cristiane Mudinutti- tel. (19) 3521 7734- (19) 3567 1233.

E-mail: crismudik@fcm.unicamp.br

Orientador (a): Profª Drª Sandra Cecília Botelho Costa- tel. (19) 3289 2351

E-mail: costa @fcm.unicamp.br

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



### Anexo 3- Características Gerais dos Pacientes estudados

Nº	INICIAIS	IDADE	SLEDAI	IgM-DATA	IgG/DATA	AGM1-DATA	PCR1-DATA
1	SLCF	53	NÃO ATIVO	NR-29/11/2006	147 UA/ml	NEGATIVO-29/11/2006	NEGATIVO-29/11/2006
2	TCV	18	NÃO ATIVO	NR-11/04/2007	58 UA/ml	NEGATIVO-11/04/2007	NEGATIVO-11/04/2007
3	JMM	31	ATIVO	NR-15/08/2007	72 UA/ml	NEGATIVO-15/08/2007	NEGATIVO-15/08/2007
4	RST	29	ATIVO	NR-13/12/2006	60UA/ml	NEGATIVO-13/12/2006	NEGATIVO-13/12/2006
5	MHLC	48	ATIVO	NR-20/12/2006	151UA/ml	NEGATIVO-20/12/2006	NEGATIVO-20/12/2006
6	NCSA	49	NÃO ATIVO	NR-25/04/2007	112UA/ml	NEGATIVO-25/04/2007	NEGATIVO-25/04/2007
7	ACS	31	NÃO ATIVO	NR-23/05/2007	94UA/ml	NEGATIVO-23/05/2007	NEGATIVO-23/05/2007
8	EGS	27	ATIVO	NR-10/01/2007	112UA/ml	NEGATIVO-10/01/2007	NEGATIVO-10/01/2007
9	ADG	55	NÃO ATIVO	Duv: 17/01/2007	111UA/ml	NEGATIVO-17/01/2007	NEGATIVO-17/01/2007
10	LC	25	NÃO ATIVO	NR-17/01/2007	90UA/ml	NEGATIVO-17/01/2007	NEGATIVO-17/01/2007
11	SMB	31	ATIVO	NR-24/01/2007	135UA/ml	NEGATIVO-24/01/2007	NEGATIVO-24/01/2007
12	MJBS	29	ATIVO	Duvi: 24/01/2007	400UA/ml	NEGATIVO-24/01/2007	POSITIVO-24/01/2007
13	ALS	50	ATIVO	NR-14/02/2007	346UA/ml	NEGATIVO-14/02/2007	NEGATIVO-14/02/2007
14	SRGS	45	ATIVO	NR-14/02/2007	175UA/ml	NEGATIVO-14/02/2007	NEGATIVO-14/02/2007
15	MEMF	43	ATIVO	NR-07/03/2007	155UA/ml	NEGATIVO-07/03/2007	NEGATIVO-07/03/2007
16	MBD	39	NÃO ATIVO	NR-14/03/2007	100UA/ml	NEGATIVO-14/03/2007	NEGATIVO-14/03/2007
17	RCDF	39	NÃO ATIVO	NR-25/07/2007	159UA/ml	NEGATIVO-25/07/2007	NEGATIVO-25/07/2007
18	SCCP	23	NÃO ATIVO	NR-04/04/2007	398UA/ml	NEGATIVO-04/04/2007	NEGATIVO-04/04/2007
19	IR	42	NÃO ATIVO	NR-04/04/2007	169UA/ml	NEGATIVO-04/04/2007	POSITIVO-04/04/2007
20	MPP	25	ATIVO	1.02UA/ml	>400UA/ml	NEGATIVO-11/04/2007	NEGATIVO-11/04/2007
21	LSR	40	ATIVO	NR.23/05/2007	203UA/ml	NEGATIVO-23/05/2007	POSITIVO-23/05/2007
22	SAM	45	ATIVO	NR23/05/2007	110UA/ml	NEGATIVO-23/05/2007	NEGATIVO-23/05/2007
23	MIFSL	50	NÃO ATIVO	NR13/06/2007	205UA/ml	NEGATIVO-13/06/2007	NEGATIVO-13/06/2007
24	KRO	42	ATIVO	NR27/06/2007	352UA/ml	NEGATIVO-27/06/2007	NEGATIVO-27/06/2007
25	BFSS	18	NÃO ATIVO	0.95UA/ml	180UA/ml	NEGATIVO-13/06/2007	NEGATIVO-13/06/2007
26	APC	45	NÃO ATIVO	NR.27/06/2007	136UA/ml	LR-27/06/2007	NEGATIVO-27/06/2007
27	LRM	30	ATIVO	NR10/07/2007	113UA/ml	NEGATIVO-10/07/2007	POSITIVO-10/07/2007
28	CMT	23	NÃO ATIVO	NR11/07/2007	179UA/ml	NEGATIVO-11/07/2007	NEGATIVO-11/07/2007
29	MASP	50	NÃO ATIVO	NR18/07/2007	209UA/ml	NEGATIVO-18/07/2007	NEGATIVO-18/07/2007
30	MAB	47	NÃO ATIVO	NR01/08/2007	209UA/ml	NEGATIVO-01/08/2007	NEGATIVO-01/08/2007
31	AEL	50	NÃO ATIVO	NR01/08/2007	208UA/ml	NEGATIVO-01/08/2007	NEGATIVO-01/08/2007
32	VLH	50	NÃO ATIVO	NR01/08/2007	178UA/ml	NEGATIVO-01/08/2007	NEGATIVO-01/08/2007
33	MFF	43	ATIVO	NR08/08/2007	162UA/ml	NEGATIVO-08/08/2007	
34	GPC	28	ATIVO	Duv.15/08/2007	200UA/ml	NEGATIVO-15/08/2007	NEGATIVO-15/08/2007
35	MMS	26	ATIVO	NR22/08/2007	107UA/ml	NEGATIVO-22/08/2007	NEGATIVO-22/08/2007
36	MPM	34	ATIVO	NR05/09/2007	67UA/ml	NEGATIVO-05/09/2007	NEGATIVO-05/09/2007
37	COS	60	NÃO ATIVO	NR.19/09/2007	107UA/ml	NEGATIVO-19/09/2007	NEGATIVO-19/09/2007
38	ESP	36	ATIVO	NR10/10/2007	159UA/ml	NEGATIVO-10/10/2007	NEGATIVO-10/10/2007
39	RCSC	49	ATIVO	NR31/10/2007	232UA/ml	LR-31/10/2007	NEGATIVO-31/10/2007
40	EAPS	50	ATIVO	NR13/06/2007	140UA/ml	LR-13/06/2007	NEGATIVO-13/06/2007

<b>N</b>	<b>AGM2-DATA</b>	<b>PCR2-DATA</b>	<b>AGM3-DATA</b>	<b>PCR3-DATA</b>
1	NEGATIVO-03/01/2007	NEGATIVO-03/01/2007		
2	NEGATIVO-09/05/2007	NEGATIVO-09/05/2007		
3	NEGATIVO-12/09/2007	POSITIVO-12/09/2007		
4	NEGATIVO-03/01/2007	NEGATIVO-03/01/2007		
5	NEGATIVO-31/01/2007	NEGATIVO-31/01/2007		
6	NEGATIVO-02/05/2007	NEGATIVO-02/05/2007		
7	NEGATIVO-13/06/2007	NEGATIVO-13/06/2007		
8	NEGATIVO-07/02/2007	NEGATIVO-07/02/2007		
9	NEGATIVO-07/02/2007	NEGATIVO-07/02/2007		
10	NEGATIVO-31/01/2007	NEGATIVO-31/01/2007		
11	NEGATIVO-07/02/2007	NEGATIVO-07/02/2007		
12	NEGATIVO-07/02/2007	POSITIVO-07/02/2007		
13	NEGATIVO-28/03/2007	NEGATIVO-28/03/2007		
14	NEGATIVO-28/03/2007	POSITIVO-28/03/2007	NEGATIVO-04/04/2007	POSITIVO-04/04/2007
15	NEGATIVO-04/04/2007	NEGATIVO-04/04/2007		
16	NEGATIVO-11/04/2007	POSITIVO-11/04/2007		
17	LR-15/08/2007	NEGATIVO-15/08/2007		
18	NEGATIVO-09/05/2007	NEGATIVO-09/05/2007		
19	LR-18/04/2007	POSITIVO-18/04/2007		
20	NEGATIVO-09/05/2007	NEGATIVO-09/05/2007		
21	NEGATIVO-31/05/2007	NEGATIVO-31/05/2007		
22	NEGATIVO-06/06/2007	NEGATIVO-06/06/2007		
23	NEGATIVO-11/07/2007	NEGATIVO-11/07/2007		
24	NEGATIVO-25/07/2007	NEGATIVO-25/07/2007		
25	NEGATIVO-25/07/2007	NEGATIVO-25/07/2007		
26	NEGATIVO-25/07/2007	NEGATIVO-25/07/2007		
27	POSITIVO+3-18/07/2007	POSITIVO-18/07/2007	LR-25/07/2007	POSITIVO-25/07/2007
28	LR-17/07/2007	NEGATIVO-17/07/2007		
29	NEGATIVO-20/08/2007	NEGATIVO-20/08/2007		
30	NEGATIVO-30/08/2007			
31	NEGATIVO-22/08/2007	NEGATIVO-22/08/2007		
32	LR-29/08/2007	NEGATIVO-29/08/2007		
33	NEGATIVO-05/09/2007	NEGATIVO-05/09/2007		
34	NEGATIVO-22/08/2007	NEGATIVO-22/08/2007		
35	LR-29/08/2007	POSITIVO-29/08/2007		
36	NEGATIVO-26/09/2007	NEGATIVO-26/09/2007		
37	NEGATIVO-17/10/2007	NEGATIVO-17/10/2007		
38	NEGATIVO-28/11/2007	NEGATIVO-28/11/2007		
39	NEGATIVO-05/12/2007			
40	NEGATIVO21/06/2007	NEGATIVO-21/06/2007		

<b>N</b>	<b>4ª COLETA / RESULTADOS - AGM / PCR</b>	<b>5ª COLETA / RESULTADOS - AGM / PCR</b>	<b>6ª COLETA / RESULTADOS AGM / PCR</b>
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14	<b>18/04/2007 / AGM - POSITIVO +21 / PCR-POS</b>	<b>25/04/2007 / AGM - POS +1 / PCR -POS</b>	<b>02/05/2007 / AGM - NEG/PCR -NEG</b>
15			
16			
17			
18			
19			
20			
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29			
30			
31			
32			
33			
34			
35			
36			
37			
38			
39			
40			

## Anexo 4: Aprovação do comitê de ética



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

[www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

2ª VIA

CEP, 27/07/07.  
(Grupo III)

**PARECER PROJETO:** Nº 789/2006 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)  
**CAAE:** 0638.0.146.000-06

### I-IDENTIFICAÇÃO:

**PROJETO: "INFECÇÃO ATIVA POR CITOMEGALOVÍRUS EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO"**

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Cristiane Mudinutti

**INSTITUIÇÃO:** HC/UNICAMP

**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 11/12/2007

**APRESENTAR RELATÓRIO EM:** 23/01/08 (O formulário encontra-se no *site* acima)

### II - OBJETIVOS

Identificar a infecção por HCMV através de: - DNA-HCMV, através de nested-PCR; - antígeno pp65 do vírus, através de antigenemia; - sorologia tipo elisa IgG e IgM. Relacionar os genótipos do vírus com a gravidade/manifestação clínica da doença.

### III - SUMÁRIO

Trata-se de um projeto de mestrado, o qual se pretende investigar a infecção pelo citomegalovírus humano nos pacientes com Lúpus Eritematoso (LE), através de marcadores de infecção ativa: a detecção do DNA e de antígenos do HCMV. Serão realizadas técnicas de genotipagem e reações sorológicas para identificar as cepas presentes, correlacionado-as com a gravidade/manifestação clínica da infecção.

### IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Projeto adequado. Não expõe o paciente a riscos, sendo a coleta de amostra de sangue o único procedimento extra ao acompanhamento de rotina. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi adequado às normas da resolução 347/05.

### V - PARECER DO CEP

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP  
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126  
Caixa Postal 6111  
13084-971 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936  
FAX (019) 3521-7187  
cep@fcm.unicamp.br

- 1 -



aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

#### VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na I Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 23 de janeiro de 2007.

  
**Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo**  
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP