

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

COINFECÇÃO VIRAL COMO ELEMENTO IMUNOMODULATÓRIO NA
TUBERCULOSE PULMONAR, EXTRAPULMONAR E NO LÚPUS
ERITEMATOSO SISTÊMICO

Bolsista: Isabela Carvalho Araújo, CNPq

MANAUS

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB-S/0090/2011

COINFECÇÃO VIRAL COMO ELEMENTO IMUNOMODULATÓRIO NA
TUBERCULOSE PULMONAR, EXTRAPULMONAR E NO LÚPUS
ERITEMATOSO SISTÊMICO

Bolsista: Isabela Carvalho Araújo, CNPq

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando de Souza Passos

MANAUS

2012

SUMÁRIO

1. RESUMO.....	04
2. INTRODUÇÃO.....	05
3. JUSTIFICATIVA.....	07
4. OBJETIVOS.....	09
4.1 OBJETIVOS GERAIS.....	09
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	09
5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
6. METODOLOGIA.....	13
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
8. CONCLUSÃO.....	26
9. REFERÊNCIAS.....	27
10. ANEXOS.....	31
10.1 CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO.....	31
10.2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	32
10.3 PROTOCOLOS DE COLETA DE DADOS.....	33

RESUMO

Estudos recentes sobre etiopatogenia do lúpus eritematoso sistêmico (LES) permitiram construir a hipótese de que vírus latentes como parvovírus B19 (B19), Epstein Baar (EBV) e citomegalovírus possam ser desencadeantes ou tenham um papel patogênico no desenvolvimento do LES.

Objetivos: Verificar a prevalência de infecção pelo B19, EBV e CMV em pacientes lúpicos, se coinfeção viral influencia no curso do LES e procurar associação da carga viral do B19, EBV e do CMV com manifestações clínicas, epidemiológicas e resposta terapêutica em pacientes com LES.

Métodos: Foram obtidas 50 amostras de sangue de pacientes com LES atendidos no Ambulatório Araújo Lima do Hospital Universitário Getúlio Vargas da cidade de Manaus. Para os controles foram obtidas 50 amostras de sangue de indivíduos saudáveis. O DNA foi extraído através de amostras utilizando o QIA Amp DNA Blood Mini Kit, e amplificado utilizando a técnica de PCR em tempo real.

Resultados: Identificou-se positividade para B19 em 2% (N=1), EBV em 16% (N=8) e CMV em 2% (N=1) dos pacientes lúpicos e positividade para B19 em 4% (N=2) e EBV em 12% (N=6) dos indivíduos saudáveis. **Conclusão:** No presente estudo não foi demonstrada associação significativa entre as infecções virais e o LES, atividade de doença, perfil sorológico e terapêutica empregada.

Palavras-chave: Lúpus eritematoso sistêmico, coinfeção viral e PCR.

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) reveste-se, na atualidade, de grande importância sanitária, devido a sua alta prevalência, letalidade, resistência antimicrobiana e acometimento de grupos populacionais especiais (GONÇALVES & PENNA, 2007).

Esta afecção tem elevada incidência no Brasil, constituindo-se em carga social e econômica para saúde por danos individuais e coletivos. São notificados de 80.000 a 90.000 casos por ano, no Brasil, desde 1980, correspondendo à taxa de incidência média de 45,2 casos por 100.000 habitantes em 2003 (GONÇALVES & PENNA, 2007).

No combate à doença é importante que se conheçam fatores de risco envolvidos na transmissão do patógeno e na susceptibilidade do hospedeiro. A reação imune engendrada contra a micobactéria é componente essencial no equilíbrio entre resistência e susceptibilidade (ELSTON & THAKER, 2008).

Apesar das evidências de imunomodulação, a coinfeção por vírus é pouco estudada na tuberculose humana, sobretudo com ferramentas atuais como a PCR em tempo real que permite verificar, além da presença do genoma, a carga viral e correlacioná-la com dados clínicos e epidemiológicos. Caso se confirme a influência da coinfeção viral no aparecimento e no curso da tuberculose, ter-se-á novos elementos para a compreensão da patogenia da doença, para a formulação de estratégias de controle e para a diminuição de seu impacto social (ELSTON & THAKER, 2008).

Já o Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença inflamatória sistêmica, considerada como o protótipo de doença autoimune. É definida por

suas características clínicas e pela presença quase invariável, no sangue, de anticorpos direcionados contra componentes celulares (MILLS, 1994).

A característica básica da doença é o desenvolvimento da autoimunidade, que tem sido atribuída à perda da “auto-tolerância”, devido a uma inadequada reatividade linfocitária, que conduz à produção de anticorpos específicos. Sua etiologia é variada, estando incluídas alterações imunológicas acarretando a produção de auto-anticorpos, ação de fatores genéticos, fatores ambientais (vírus, radiação ultravioleta, drogas), fisiológicos (hormônios) e o estresse (WEENING *et al.*, 2004; DAVIDSON & ARANOW, 2006).

Atualmente, tem-se discutido o papel das infecções virais como fator desencadeante de doenças autoimunes. Estudos relatam que o parvovírus B19, o vírus Epstein Barr (EBV) e o citomegalovírus (CMV) podem servir de gatilho ou serem agravantes das alterações autoimunes. (KALDEN & GAY, 1994; COOKE *et al.*, 1998; NILLER *et al.*, 2008; VERDOLINI *et al.*, 2002).

JUSTIFICATIVA

Os vírus desempenham um papel importante nas doenças autoimunes, sendo os vírus EBV, CMV e B19 frequentemente citados como desencadeantes ou agravantes das alterações autoimunes (KALDEN & GAY, 1994; COOKE *et al.*, 1998; NILLER *et al.*, 2008; VERDOLINI *et al.*, 2002).

O vírus EBV pertence à família Herpesviridae e é o agente etiológico da mononucleose infecciosa. O ciclo viral, no interior do hospedeiro, inclui um período de latência, em cujo estado pode permanecer anos, e outro de replicação, no qual pode emergir em quantidade suficiente para causar estimulação do sistema imune (McCLAIN *et al.*, 2003).

O antígeno nuclear 1 do EBV (EBNA-1) é a mais importante proteína viral expressa no interior dos linfócitos B durante o período de latência e é o alvo mais comum da resposta imune humoral. Anticorpos dirigidos contra esta proteína podem reagir de forma cruzada com proteínas humanas e parecem desempenhar um importante papel nas doenças autoimunes, podendo estar relacionados à tuberculose e ao LES (KATZ *et al.*, 2001; ORIGGI *et al.*, 1988; JAMES *et al.*, 2001; PAPAGEORGIOU *et al.*, 1973, SAHA & SEHGAL & SHARMA, 1982; YEWDELL & HILL, 2002; NILLER & WOLF & MINAROVITS, 2008).

O CMV provoca amplo espectro de distúrbios em crianças maiores e adultos, variando desde infecção subclínica e assintomática, ou síndrome de mononucleose em indivíduos saudáveis, até doença disseminada em pacientes imunocomprometidos. Em modelos experimentais com roedores, a infecção por citomegalovírus é capaz de induzir diversas anormalidades autoimunes que lembram aquelas encontradas no LES. Em adição, um papel potencial do CMV

no desenvolvimento e/ou progressão do LES tem sido sugerido (CHAKRAVARTI *et al.*, 2009; CROUGH *et al.*, 2009; SEKIGAWA *et al.*, 2002).

O B19 pertence à família Parvoviridae sendo endêmico em quase todas as regiões do mundo. Infecta exclusivamente os seres humanos e sua transmissão ocorre principalmente por via respiratória seguida pelo aparecimento de erupção e artralgia, que parecem resultar do depósito de imunocomplexos. A detecção de títulos altos para B19 no sangue é comum. A transmissão pode ocorrer por transfusão, mas comumente com hemocomponentes obtidos de vários doadores. Há evidências crescentes que o eritrovírus B19 está envolvido na patogênese de doenças reumática crônicas como o LES especialmente nas crianças (LUNARDI *et al.*, 2008; ASLANIDIS *et al.*, 2008; SÈVE *et al.*, 2005; SEVERIN *et al.*, 2003).

Não existem pesquisas no Brasil que associem coinfeções virais latentes com tuberculose e com doenças autoimunes como o LES. A confirmação do papel imunomodulador/imunodepressor de coinfeção por viroses latentes permitirá ampliar a compreensão da patogenia da doença e formulação de estratégias mais adequadas de controle, sendo de grande interesse para a comunidade médica e científica.

O projeto em questão está inserido em um projeto de pesquisa maior, já aprovado para financiamento pela FAPEAM no edital PPSUS-2009.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Verificar se coinfeção viral influencia o aparecimento da tuberculose humana, em sua forma pulmonar e extrapulmonar, e o curso do LES.

Objetivos Específicos

a) Verificar a carga viral do EBV em pacientes com tuberculose, comparando-a a de contactantes de TB sadios.

b) Verificar a carga viral dos vírus CMV e B19 em pacientes com tuberculose, comparando-as às de contactantes de TB sadios.

c) Verificar a carga viral dos vírus EBV, CMV e B19 em pacientes com LES, comparando-as às de controles sadios.

d) Procurar associação da carga viral do EBV, do CMV e do B19 com manifestações clínicas, epidemiológicas e resposta terapêutica em pacientes com tuberculose e com LES.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O LES é uma doença inflamatória sistêmica, protótipo da doença autoimune, caracterizada por uma explosão de autoanticorpos séricos que causam lesão tecidual. É uma doença complexa com manifestações clínicas de intensidade e gravidade variáveis (MILLS, 1994; ARDOIN & PISETSKY, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2010).

A prevalência de LES na população é de 20 a 150 casos por 100.000 habitantes. E a incidência estimada é de 1 a 25 por 100.000 habitantes na América do Sul. A doença é mais comum em mulheres e sessenta e cinco por cento dos pacientes com LES têm o início da doença entre 16 e 55 anos (SCHUR & HAHN, 2012).

Basicamente, parece haver defeito no *clearance* de células apoptóticas, permitindo estimulação do sistema imunológico por apresentação de autoantígenos, perda de tolerância imunológica, ativação policlonal de linfócitos B, produção de autoanticorpos, diminuição do *clearance* de imunocomplexos e falha nos mecanismos supressores e de regulação imunológica (SATO, 2008).

A etiologia do LES é desconhecida e, provavelmente, multifatorial. Envolve predisposição genética, fatores hormonais, imunológicos e ambientais. Dentre os prováveis fatores etiológicos ou etiopatogênicos, a infecção viral tem sido muito citada em trabalhos. (SCHUR & HAHN, 2012; KALDEN & GAY, 1994).

Segundo JAMES & ROBERTSON pacientes com LES têm títulos mais elevados de anticorpos para o vírus EBV e cargas virais de EBV circulantes estão aumentadas. As proteínas constituintes do vírus se assemelham a autoantígenos e podem, em indivíduos geneticamente

predispostos, desenvolver resposta imune por mimetismo molecular (ARDOIN & PISETSKY, 2008).

Segundo MOON *et al.* o EBV é suspeito de ter um papel na predisposição ao LES por vários motivos. Em primeiro lugar, o EBV promove a proliferação de células B após a infecção, e assim constitui uma expressão antigênica prolongada. Esta expressão prolongada do antígeno do EBV pode desencadear LES em indivíduos geneticamente predispostos. Em segundo lugar, as células B infectadas pelo EBV podem tornar-se uma fonte contínua de autoanticorpos. Em terceiro lugar, existem sequências homólogas entre autoantígenos do LES e algumas proteínas do EBV, tais como EBNA-1 e EBNA-2. Os anticorpos produzidos por estes antígenos virais podem reagir de forma cruzada com autoantígenos e servir de gatilho para o LES.

O B19 foi recentemente associado com algumas doenças reumáticas, mais especificamente com o LES. Embora não esteja claro seu envolvimento, se é um gatilho ou se simplesmente tem similaridade com o LES (SEVERIN *et al.*, 2003)

As semelhanças entre o LES e a infecção pelo B19 são tão marcantes que muitos pacientes são diagnosticados inicialmente com LES. Além disso os pacientes podem preencher os critérios definidos pelo ACR (SEVERIN *et al.*, 2003).

Tovari *et al.* relataram um caso em que o parvovírus pode ter agido como um gatilho ou ter agravado um processo subjacente de autoimunidade. (TOVARI *et al.*, 2002).

Bengtsson *et al.* avaliaram a prevalência de infecção por parvovírus tanto em pessoas lúpicas quanto em pessoas saudáveis e descobriram que a infecção era mais comum entre os controles.

Em modelos experimentais com roedores, a infecção por CMV é capaz de induzir diversas anormalidades autoimunes que lembram as encontradas no LES. Em adição, um papel potencial do CMV no desenvolvimento e/ou progressão do LES tem sido sugerido (SEKIGAWA *et al.*, 2002)

A TB é uma afecção de elevada incidência. A incidência global de TB atingiu o pico por volta de 2003 e parece estar diminuindo lentamente. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2010, 8,8 milhões de pessoas adoeceram com tuberculose e 1,4 milhão morreram. (HORSBURGH *et al.*, 2012).

Fatores genéticos e ambientais são fundamentais na modulação da resposta imune e no desenlace clínico da doença. Incluem-se o estado nutricional, condições sócio-econômicas, comorbidades, uso de medicações imunossupressoras e a coinfeção por patógenos que tendem a diminuir a resposta imune do hospedeiro (ELSTON & THAKER, 2008).

METODOLOGIA

1. Local de Realização das Várias Etapas;

O projeto está registrado no Comitê de Ética na Pesquisa da UFAM sob o número CAAE 0077.0.115.000-10.

O recrutamento de pacientes e controles foi desenvolvido no serviço de Pneumologia e de Reumatologia do Ambulatório Araújo Lima/Hospital Universitário Getúlio Vargas (HUGV) da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e na Policlínica Cardoso Fontes da Secretaria Estadual de Saúde do Amazonas.

As atividades laboratoriais (extração de DNA, amplificação de ácido nucléico viral) foram realizadas na Fundação Oswaldo Cruz em Manaus, sob a tutela do prof. Felipe Naveca.

2. Critérios para o recrutamento de pacientes com TB:

a. Critérios de inclusão:

Ter tuberculose pulmonar ou extrapulmonar, diagnosticada pela primeira vez, com comprovação bacteriológica, antes de iniciar o tratamento; ambos os sexos, com idade entre 18 e 36 anos, mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

b. Critérios de exclusão:

Soropositividade para o HIV; imunossupressão farmacológica (corticóides, citotóxicos, “biológicos”); gestantes; transplantados; doenças crônicas debilitantes (câncer avançado, uremia em diálise, cirrose hepática, etc); autoimunidade sistêmica (lúpus eritematoso sistêmico, dermatomiosite e esclerodermia) com doença ativa ou não.

3. Critérios para recrutamento de pacientes com LES:

a. Critérios de inclusão:

Pacientes diagnosticados LES conforme os critérios do American College of Rheumatology (1982) de ambos os sexos e com idade entre 18 e 36 anos em acompanhamento no serviço de reumatologia do Ambulatório Araújo Lima, mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

b. Critérios de exclusão:

Soropositividade para o Vírus da Imunodeficiência Humana Adquirida (HIV), gestantes, transplantados, doenças crônicas debilitantes (Câncer avançado, uremia em diálise, cirrose hepática e etc.), pacientes que se recusaram a participar do estudo em qualquer momento do projeto e pacientes cujo PCR não foi realizado.

4. Controle dos pacientes com TB:

a. Critérios de inclusão:

Co-habitante há mais de 6 meses em residência de paciente recém-diagnosticado bacteriologicamente com tuberculose pulmonar; pareado por sexo e idade com os casos de tuberculose (tolerância de mais ou menos três anos para a idade).

b. Critérios de exclusão:

Soropositividade para HIV; ter tido tuberculose anteriormente; gestantes; imunossupressão farmacológica (corticóides, citotóxicos, “biológicos”); doenças debilitantes (câncer avançado, uremia em diálise, cirrose hepática, etc); autoimunidade sistêmica (lúpus eritematoso sistêmico, dermatomiosite e esclerodermia), com doença ativa ou não.

5. Critérios para recrutamento de indivíduos saudáveis como grupo controle dos pacientes com LES:

a. Critérios de inclusão:

Pessoas pareadas por sexo e idade (± 3 anos) com os casos de LES; características sócio-econômicas com os casos de tuberculose; que não fossem portadores de qualquer doença aparente; por auto-relato; por avaliação clínica feita pelos pesquisadores; mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

b. Critérios de exclusão:

Soropositividade para o HIV, gestantes, ter alguma doença crônica conhecida, mesmo em estádios iniciais, incluindo DPOC, asma, câncer, diabetes melitus, cardiopatias, nefropatias (creatinina $> 3,0\text{mg}\%$), hepatopatias, neuropatias e autoimunidade sistêmica.

6. Número de indivíduos a serem incluídos na pesquisa:

Foram recrutados, no período de 01 de agosto de 2011 a 31 de julho de 2012, 50 pacientes com diagnóstico de tuberculose, 50 pessoas contactantes, 50 pacientes com LES e 50 controles saudáveis no Ambulatório Araújo Lima e na Policlínica Cardoso Fontes.

7. Desenho do estudo:

Trata-se de um estudo observacional, transversal, prospectivo, caso-controle para caracterizar a associação de coinfeção viral com a ocorrência de doenças imunomediadas, como tuberculose e o Lúpus Eritematoso Sistêmico.

8. Etapas do estudo

Os participantes com diagnóstico de TB e de LES que atendiam aos critérios de inclusão e exclusão foram convidados de forma sequencial, assinaram o TCLE e foram submetidos à coleta de sangue para realização do PCR para medir a carga dos vírus B19, EBV e CMV. Os pacientes com tuberculose foram acompanhados para registro de resposta terapêutica. O

mesmo processo foi realizado com os contactantes de pacientes com TB e com os indivíduos saudáveis, o grupo controle.

Foram coletados 5 mL de sangue periférico em tubo contendo anti-coagulante EDTA (ácido etileno diamino tetra-acético) dos pacientes e dos indivíduos controles. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Virologia da Fiocruz onde foi realizada a extração de DNA.

Na extração de DNA foi utilizado o Kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante. O procedimento de extração de DNA foi realizada de forma automática com utilização do robô de extração QIAcube (QIAGEN) com eluição final de 100 µL e armazenada a -80°C até o momento de uso para a reação em cadeia da polimerase.

A PCR tempo real foi realizada para a detecção simultânea dos vírus Parvovírus B19, Epstein-Barr e Citomegalovírus, assim como, sendo também utilizada para detecção de DNA endógeno a β -Actina. Em cada reação de PCR foi utilizado 10 µL Taqman[®] Fast Advanced Mastex Mix (Applied Biosystems) com utilização das concentrações de 300nm e 100nm para iniciadores e sonda, respectivamente. A PCR tempo real foi realizada em StepOnePlus[™] System (Applied Biosystems) com o respectivo programa: uma primeira etapa de incubação a 50°C por dois minutos, uma desnaturação a 95°C por 20 segundo, seguido de 40 ciclos de 95°C por um segundo e 60°C por 20 segundos.

9. Análise estatística:

Os dados foram coletados por meio de formulários padronizados e armazenados em banco de dado específico. Foi realizada a análise descritiva dos dados por meio de média, mediana e desvio padrão para as variáveis numéricas e através de medidas de frequência (absoluta e relativa) para as variáveis categóricas. O processamento foi feito no pacote estatístico Epi-info. O tratamento estatístico consistiu nos testes do qui-quadrado para variáveis categóricas, teste t para variáveis contínuas gaussianas ou Mann-Whitney para situações não paramétricas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foram avaliados 200 indivíduos, sendo que destes 25% (n=50) eram portadores de LES, 25% (n=50) eram indivíduos não portadores desta afecção reumática, ou seja, do grupo controle, 25% (n=50) eram indivíduos diagnosticados com tuberculose e 25% (n=50) eram contactantes de indivíduos com tuberculose.

A idade dos indivíduos que apresentavam LES variou entre 21 e 36 anos, sendo a idade média de $28,24 \pm 4,22$ (média \pm desvio padrão da média). Em relação ao sexo, 96% (n=48) eram do sexo feminino, enquanto apenas 4% (n=2) eram do sexo masculino. Neste estudo encontramos um predomínio de mulheres em idade fértil. Este dado está de acordo com o encontrado na literatura, onde a relação entre mulheres e homens é estimada em 9:1.

O tempo de doença dos indivíduos com LES variou entre 0 e 16 anos, sendo o tempo médio de $6,0 \pm 4,47$ anos.

De uma forma geral, em relação à atividade da doença entre os indivíduos que apresentavam LES (n=50), 22% (n=11) apresentavam atividade cutâneo-articular, 6% (n=3) apresentavam atividade hematológica, 2% (n=1) apresentavam atividade neurológica e 14% (n=7) apresentavam atividade renal.

ATIVIDADE DO LES	FREQUÊNCIA	
	RELATIVA	ABSOLUTA
CUTÂNEO-ARTICULAR	22%	11
HEMATOLÓGICA	6%	3
NEUROLÓGICA	2%	1
RENAL	14%	7

Tabela 1: Frequência relativa e absoluta da atividade do LES.

Em relação aos envoltimentos específicos, 6% (n=3) apresentavam doença renal grave, 6% (n=3) AHAI, 2% (n=1) SJÖGREN, 2% (n=1) Overlap ESP e 4% (n=2) Overlap DM no momento da entrevista.

ENVOLVIMENTOS ESPECÍFICOS	FREQUÊNCIA	
	RELATIVA	ABSOLUTA
DOENÇA RENAL GRAVE	6%	3
AHAI	6%	3
SJÖGREN	2%	1
OVERLAP ESP	2%	1
OVERLAP DM	4%	2

Tabela 2: Frequência relativa e absoluta de envoltimentos específicos no LES.

A maior parte dos indivíduos com LES (72%) apresentavam SLEDAI de 0 a 5.

SLEDAI	FREQUÊNCIA
0 A 5	72% (N=36)
6 A 11	18% (N=9)
12 A 16	10% (N=5)

Tabela 3: Frequência relativa e absoluta de faixa de SLEDAI.

Quanto à sorologia, 94% (n=47) apresentavam FAN, 24% (n=12) apresentavam FAN com padrão nuclear homogêneo, 20% (n=10) apresentavam anti-DNA, 18% (n=9) anti-DNA negativo e 62% (n=31) não realizaram o teste.

Em relação ao tratamento 94% (n=47) estavam em uso de prednisona, 74% (n=37) de Cloroquina/Hidroxicloroquina, 14% (n=7) de MFM, 14% (n=7) de AZA, 24% (n=12) de MTX e 10% (n=5) em uso de anticoagulante.

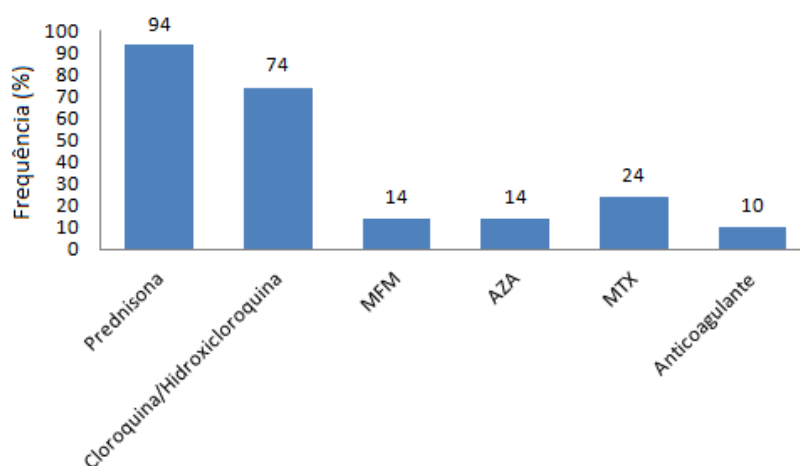


Gráfico 1: Frequência relativa e absoluta da terapia utilizada nos pacientes com LES.

Primeiramente foi verificada a presença qualitativa dos genomas virais no sangue. Entre os indivíduos portadores de LES (n=50), 2% (n=1) apresentavam B19 positivo, 16% (n=8) EBV positivo e 2% (n=1) CMV positivo.

Já entre os indivíduos do grupo controle, 4% (n=2) apresentavam B19 positivo, 12% (n=6) EBV positivo e 100% (n=50) CMV negativo.

Vírus	LES			Grupo Controle		
	B19	EBV	CMV	B19	EBV	CMV
n	1	8	1	2	6	0

Tabela 4: Frequência absoluta de infecção viral em pacientes com LES e indivíduos saudáveis.

Não houve relação significativa entre LES e B19 (teste exato de Fischer, P=1), LES e EBV (teste de qui-quadrado, P=0,5644) e LES e CMV (teste exato de Fischer, P=1).

Na tabela 5 encontramos a frequência de indivíduos com infecção viral e a carga viral média.

INFECÇÃO VIRAL		
CARGA VIRAL MÉDIA (CVM)	LES	CONTROLE
B19 POSITIVO	2% (N=1)	4% (N=2)
CVM	1	1
EBV POSITIVO	16% (N=8)	12% (N=6)
CVM	1,37±0,33	1,52±1,27
CMV POSITIVO	2% (N=1)	-
CVM	1	

Tabela 5: Frequência relativa e absoluta de infecção viral em pacientes com LES e indivíduos saudáveis e carga viral média em UI/ml.

Os dados referentes à atividade da doença estão representados na tabela 6.

ATIVIDADE DO LES	VÍRUS		
	B19 POSITIVO	EBV POSITIVO	CMV POSITIVO
CUTÂNEO-ARTICULAR	9,1% (N=1)	9,1% (N=1)	9,1% (N=1)
HEMATOLÓGICA	-	-	-
NEUROLÓGICA	-	100% (N=1)	-
RENAL	-	-	-

Tabela 6: Frequências relativa e absoluta de indivíduos com LES, de acordo com a atividade de doença e sua relação com a infecção viral. Não houve relação significativa entre a infecção viral e a atividade de doença.

Os dados da sorologia estão representados na seguinte tabela 7.

SOROLOGIA	VÍRUS		
	B19 POSITIVO	EBV POSITIVO	CMV POSITIVO
Anti-DNA	-	-	-
Anti-SM	-	-	-
Anti-Ro	-	-	-
Anti-La	-	-	-
Anti-RNP	-	-	-
Anti-cardiolipina	-	16,6% (N=1)	-

Tabela 7: Frequências relativa e absoluta de indivíduos com LES, de acordo com autoanticorpos observados, e sua relação com a infecção viral. Não houve relação entre os autoanticorpos e a presença de infecção viral.

Em relação ao tratamento, os dados estão apresentados na tabela 8.

TERAPÊUTICA	VÍRUS		
	B19 POSITIVO	EBV POSITIVO	CMV POSITIVO
Prednisona	1	6	1
Cloroquina /Hidroxicloroquina	1	6	1
MFM	-	-	-
AZA	-	1	-
MTX	-	1	-
CYF	-	-	-
Talidomida	-	-	-
Rituximab	-	-	-

Tabela 8: Frequências relativa e absoluta de indivíduos com LES, de acordo com a terapia utilizada e sua relação com a infecção viral. Não houve relação significativa entre a infecção viral e a terapia utilizada.

De uma forma geral a frequência de indivíduos positivos para os vírus estudados em cada população podem ser observadas no gráfico 2.

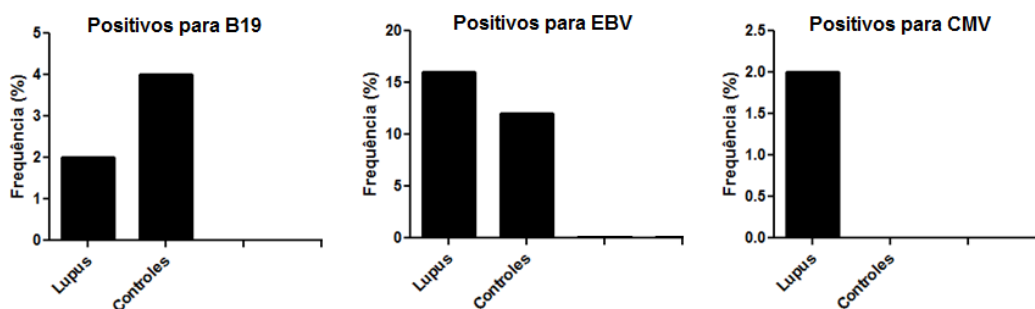


Gráfico 2: Frequência relativa e absoluta de infecção viral para cada vírus em pacientes com LES e indivíduos saudáveis.

A idade dos indivíduos com tuberculose variou entre 18 e 36 anos, sendo a idade média de $26,46 \pm 5,13$ (média \pm desvio padrão da média). Em relação ao sexo, 56% (n=28) eram do sexo feminino, enquanto 44% (n=22) eram do sexo masculino. Em relação à procedência 98% (N=49) eram da cidade de Manaus e 2% (N=1) eram do interior.

Os dados referentes ao diagnóstico como Raio-X, baciloscopia, cultura e histopatológico podem ser observados na seguinte tabela:

DIAGNÓSTICO	FREQUÊNCIA	
	RELATIVA	ABSOLUTA
RAIO-X		
Não realizado	6%	3
Suspeito	94%	47
BACILO (ESCARRO)		
1 e 2 negativos	2%	1
1 e 2 positivos	68%	4
1 positivo	22%	11
1 negativo/2 positivo	4%	2
1 positivo/2 negativo	2%	1
Não realizado	2%	1
CULTURA		
Não realizada	98%	49
Positiva	2%	1
HISTOPATOLÓGICO		
BAAR positivo	6%	3
Em andamento	2%	1
BAAR negativo	2%	1
Não realizado	9%	45

Tabela 9: Frequência absoluta e relativa de variáveis de diagnóstico.

Os dados referentes à terapêutica utilizada podem ser observados na seguinte tabela:

TERAPÊUTICA	FREQUÊNCIA	
	RELATIVA	ABSOLUTA
COXIP	38%	19
Levofloxacina	2%	1
Pirazinamida	2%	1
RIPE	56%	28
RIPE+EE	2%	1

Tabela 10: Frequência absoluta e relativa de dados de terapêutica.

Os resultados da PCR dos pacientes com tuberculose e do grupo controle ainda estão em andamento.

Não encontrou-se neste trabalho uma associação estatisticamente significativa entre o LES e os vírus testados. Visto que somente 2% (N=1) dos indivíduos lúpicos foram positivos para B19, 16% (N=8) positivos para EBV e apenas 2% (N=1) foram positivos para CMV.

Dentre as possíveis explicações para estes baixos níveis de infecção viral, a existência de erros sistemáticos foi descartada. Pois observamos que os níveis de β -actina, proteína utilizada como controle da reação em cadeia da polimerase, sempre foram altos.

Os vírus também podem não ter sido detectados pelo PCR por estarem latentes, em fase inicial de replicação. Outro fator que também pode ter contribuído com os resultados foi a presença de viés de amostragem, uma vez que os pacientes lúpicos estavam com a doença em estabilidade.

Os pacientes também podem não terem sido infectados pelos vírus e testes posteriores são necessários como a sorologia IgG que será realizada posteriormente.

Dessa forma, o B19, o VEB e o CMV podem não ser um fator desencadeante para o desenvolvimento do LES. Apesar de inúmeros trabalhos associarem estes vírus a doenças reumáticas.

SEVERIN *et al.* relataram casos de pacientes que inicialmente foram diagnosticados com LES, tendo cumprido 3-5 critérios de classificação do Colégio Americano de Reumatologia, atualmente utilizado para diagnóstico de LES, apenas para descobrirem mais tarde que estavam infectados pelo B19. Levantando a suspeita de que a parvovirose possa agir como um gatilho ou simplesmente imitar o LES.

Por outro lado BENGTTSSON *et al.* avaliaram a prevalência de infecção por B19 tanto na população com LES quanto na população geral, e descobriram que a infecção pelo B19 era mais comum entre os controles saudáveis. O mesmo aconteceu neste trabalho. Em que 4% (N=2) dos controles saudáveis foram positivos para B19 e apenas 2% (N=1) dos pacientes lúpicos foram positivos para o mesmo vírus.

Entre os pacientes lúpicos que eram positivos para B19, não houve evidência estatística para afirmar a influência da infecção viral na atividade da doença e terapia utilizada.

PARKS *et al.* examinaram a soroprevalência de EBV em um estudo populacional de pacientes com LES do sudeste dos Estados Unidos. Estes estudos sugeriram uma forte associação entre o LES e a presença de IgA-EBV, marcador de reinfecção ou reativação, em afro-americanos. Além de apresentarem altos níveis de IgG-EBV em comparação com o grupo controle. O que pode refletir na exposição dos pacientes lúpicos ao EBV no passado.

ORIGGI *et al.* também reforçaram a suspeita de tal associação pelo achado de altos títulos de anticorpos anti-EBV em pacientes com LES.

Entretanto, no presente estudo não houve evidência estatística para afirmar a influência da infecção pelo EBV no desenvolvimento do LES, assim como na atividade de doença e na terapia utilizada.

NAWATA *et al.* relataram o caso de um paciente com LES que apresentava títulos elevados de anticorpos IgM para CMV, sugerindo infecção por CMV no início do LES e associação entre a infecção e surgimento da doença. Da mesma forma, RAMOS *et al.* também citam em seus trabalhos casos de pacientes com infecção por CMV e LES e sugerem tal associação.

Segundo SEKIGAWA a infecção por citomegalovírus é conhecida por induzir alterações autoimunes em ratos, que se assemelham às encontradas no LES.

Trabalhos anteriores relataram níveis de IgM para CMV ligeiramente mais comuns entre pacientes com LES do que em controles, porém sem diferença significativa (PARKS *et al.*, 2005). Da mesma forma que no presente estudo, em que 2% (N=1) dos pacientes lúpicos foram positivos para CMV e nenhum controle saudável foi positivo para o mesmo vírus. Não havendo evidência estatística de associação entre o CMV e o desenvolvimento do LES.

O presente estudo, portanto, não fornece novas evidências sobre a relação entre o LES e os vírus B19, EBV e CMV.

CONCLUSÃO

No presente estudo não foi demonstrado associação significativa entre as infecções virais por B19, EBV e CMV e o LES, atividade de doença, perfil sorológico e terapêutica empregada.

Os resultados podem ter sido consequência de viés de amostragem, visto que os pacientes estavam com a doença estabilizada, ou incapacidade do exame de detectar baixos níveis de carga viral.

Porém ainda são necessários outros trabalhos a fim de determinar o real potencial patogênico do B19, EBV e CMV dentro do sistema imune, sua capacidade de induzir uma resposta autoimune alterada, modificar o curso clínico ou desencadear o LES em indivíduos geneticamente predispostos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) ADELMAN, M.K.; MARCHALONIS, J.J. Endogenous retroviruses in systemic lupus erythematosus: candidate lupus viruses. *Clin Immunol.*102(2):107-16. Feb 2002.
- 2) ARDOIN, S. P.; PISETSKY, D. S. Developments in the scientific understanding of lupus. *Arthritis Research & Therapy*, North Carolina, V.10, N.5, p. 1-8, Oct, 2008.
- 3) ASLANIDIS, S.; PYRPASOPOULOU, A.; KONTOTASIOS, K.; DOUMAS, S.; ZAMBOULIS, C. Parvovirus B19 infection and systemic lupus erythematosus: Activation of an aberrant pathway? *Eur J Intern Med.* 2008 Jul;19(5):314-8. Epub 2007 Nov 19.
- 4) BENGTSSON, A.; WIDELL, A.; SOLVE, E.; STURFELT, G. No serological indications that systemic lupus erythematosus is linked with exposure to human parvovirus B19. *Annals of the rheumatic diseases*, v.59, p.64-66, 2000.
- 5) CHAKRAVARTI, A.; KASHYAP, B.; MATLANI M. Cytomegalovirus infection: an Indian perspective. *Indian J Med Microbiol*, 27(1):3-1, Jan-Mar, 2009.
- 6) COOKE, S.P.; RIGBY, S.P.; GRIFFITHS, D.J.; VENABLES, P.J. Viral studies in rheumatic disease. *Ann Med Interne (Paris)*, 149(1):30-3, 1998.
- 7) CROUGH, T.; KHANNA, R. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev.*, 22(1):76-98, Jan 2009.
- 8) DANAOK, T.; REGHETTI, G.; YEN-LIEBERMAN, B.; STARKEY, C.; WAKASUGI, K.; MCLEAN-JOHNSON, W.; CLOUGH, J. Antibodies to the human T lymphocytotropic type I in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol.* 1991 Jan-Feb;9(1):55-8.

- 9) DAVIDSON, A.; ARANOW, C. Pathogenesis and treatment of systemic lupus erythematosus nephritis. *Curr Opin Rheumatol*, 18(5):468-75, 2006.
- 10) ELSTON, J.W.; THAKER, H.K.B. Co-infection with human immunodeficiency virus and tuberculosis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 74:194-199, 2008.
- 11) GONÇALVES, M. J. F.; PENNA, M. L. F. Morbidade por tuberculose e desempenho do programa de controle em municípios brasileiros, 2001-2003. *Rev. Saúde Pública* vol.41 suppl.1 São Paulo Sept., 2007.
- 12) JAMES, J. A.; NEAS, B. R.; MOSER, K. L.; HALL, T.; BRUNER, G.R.; SESTAK, A. L. et al. Systemic lupus erythematosus in adults is associated with previous Epstein-Barr virus exposure. *Arthritis Rheum* 2001;44(5):1122-6.
- 13) JAMES, J.A.; ROBERTSON, J.M. Lupus and Epstein-Barr. *Curr Opin Rheumatol*, Oklahoma, v.24, p.1-6, 2012.
- 14) KALDEN, J.R.; GAY, S. Retroviruses and autoimmune rheumatic diseases. *Clin Exp Immunol*, 98(1): 1–5, October 1994.
- 15) KATZ, B.Z.; SALIM, I.B.; KIM, S.; NSIAH-KUMI, P.; WEINEL, W. Epstein-Barr virus burden in adolescents with systemic lupus erythematosus. *Pediatr Infect Dis J*, 20(2):148-53, 2001.
- 16) LUNARDI, C.; TINAZZI, E.; BASON, C.; DOLCINO, M.; CORROCHER, R.; PUC CETTI A. Human parvovirus B19 infection and autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2008 Dec;8(2):116-20.
- 17) MCCLAIN, M.T.; RAPP, E. C.; HARLEY, J. B.; JAMES, J.A. Infectious mononucleosis patients temporarily recognize a unique, cross-reactive epitope of Epstein Barr virus nuclear antigen-1. *Journal of Medical Virology*. v. 70, p. 253-257, 2003.
- 18) MOON, U. Y.; PARK, S. J., OH, S. T., KIM, W., PARK, S., LEE, S., CHO, C.; KIM, H.; LEE, W.; LEE, S. K.; Patients with systemic lupus erythematosus have abnormally elevated Epstein–Barr virus load in blood. *Arthritis Research & Therapy*, Korea, v. 6 n. 4, 2004.
- 19) MILLS, J.A. Systemic Lupus erythematosus. *N Engl J Méd*, 330:1871-1879, 1994.

- 20)NILLER, H.H.; WOLF, H.; MINAROVITS, J. Regulation and dysregulation of Epstein-Barr virus latency: implications for the development of autoimmune diseases. *Autoimmunity*. 41(4):298-328, May 2008.
- 21)ORIGGI, L.; PEREGO, R.; HU, C.; BERTETTI, E.; D'AGOSTINO P.; ASERO, R. Anti-Epstein-Barr virus antibodies in systemic lupus erythematosus. *Boll Ist Sieroter Milan*, 67(2):116-22, 1988.
- 22)PAPAGEORGIU, P.; SOROKIN, C.F.; KOUZOUTZAKOGLU, K.; BONFORTE, R.J.; WORKMAN, P.L.; GLADE, P.R. Host Responses to Epstein-Barr Virus and Cytomegalovirus Infection in Leprosy. *Infect Immun*, 7(4): 620-624, 1973.
- 23)PARKS, C. G.; COOPER, G. S.; HUDSON, L. L.; DOOLEY, M. A.; TREADWELL, E. L.; CLAIR, E. W.; GILKESON, G. S.; PANDEY, J. P. Lupus Erythematosus Effect Modification by Race, Age, and Cytotoxic T Lymphocyte–Associated Antigen 4 Genotype. *Arthritis & Rheumatism*, v. 52, p.1148-1150, 2005.
- 24)RIBEIRO, F.M.; KRAVITZ, M.S.; KLUMB, E.M.; LANNES, G; RIBEIRO, F.R.E, ALBUQUERQUE, E.M.M, SHOENFELD, Y. Can Lupus Flares be Associated with Tuberculosis Infection? *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, New York, v.38, p. 163-168, jun, 2010.
- 25)SAHA, K.; SEHGAL, V.N.; SHARMA, V. High incidence of IgG class of Epstein-Barr virus capsid antibody in Indian patients of lepromatous leprosy. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 76(3):311-3, 1982.
- 26)SCHUR, P. H.; HAHN, B. H. Epidemiology and pathogenesis of systemic lupus erythematosus, disponível em:
http://www.uptodate.com/contents/epidemiology-and-pathogenesis-of-systemiclupuserythematosus?source=search_result&search=Epidemiology+and+pathogenesis+of+systemic+lupus+erythematosus&selectedTitle=1%7E150 , 2012.
- 27)SEKIGAWA, I.; NAWATA M.; SETA, N., YAMADA, M.; IIDA, N.; HASHIMOTO, H. Cytomegalovirus infection in patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical and Experimental Rheumatology*, v. 20, p. 559–64, 2002.

- 28)SEVERIN, M.C.; LEVY, Y.; SHOENFELD, Y. Systemic lupus erythematosus and parvovirus B-19: casual coincidence or causative culprit? *Clin Rev Allergy Immunol.* Aug;25(1):41-8, 2003.
- 29)TOVARI, E.; MEZEY, I., HEDMAN, CZIRJAK, L.; Self limiting lupus-like symptoms in patients with parvovirus B19 infection. *Annals of the rheumatic diseases*, V. 61, 662-663, 2002.
- 30)VERDOLINI, R.; BUGATTI, L.; GIANGIACOMI, M.; NICOLINI, M.; FILOSA, G.; CERIO, R. Systemic lupus erythematosus induced by Epstein-Barr virus infection. *Br J Dermatol*, 146(5):877-881, 2002.
- 31)WEENING, J. J.; D'AGATI, VIVETTE, D.; SCHWARTZ, M. M.; et al. The classification of glomerulonephritis in systemic Lupus erythematosus revisited. *Kidney International*, 65: 521-530, 2004.
- 32)YEWDELL, J.W.; HILL, A.B. Viral interference with antigen presentation. *Nature Immunol.* 3(11):1019-1025, 2002.

ANEXOS

1. CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

Nº	Descrição	Ago 2011	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2012	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
1	Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
2	Recrutamento de pacientes dos grupos experimental e controle	X	X	X	X	X	X						
3	Coleta de dados clínicos e sócio-demográficos	X	X	X	X	X	X						
4	Treinamento em Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)	X	X	X	X								
5	Coleta de Material Biológico	X	X	X	X	X	X						
6	Realização de Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)			X	X	X	X	X	X	X			
7	Análise parcial dos resultados					X	X						
8	Elaboração e entrega de Relatório Parcial						X	X					
9	Análise estatística dos resultados									X	X	X	
10	Elaboração do Resumo e Relatório Final											X	X
11	Preparação da Apresentação Final para o Congresso												X

2. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Os pesquisadores Luiz Fernando de Souza Passos (orientador) e Isabela Carvalho Araújo (bolsista) pedem autorização para fazer coleta de sangue, avaliar seu prontuário, avaliar exames de sangue e de imagem que irão ajudar na realização das atividades do Projeto de Pesquisa "Coinfecção Viral como Elemento Imunomodulatório na Tuberculose Pulmonar, Extrapulmonar e no Lúpus Eritematoso Sistêmico". Se você autorizar essa avaliação, utilizaremos seu prontuário e exames para colher dados clínicos para a formação de um banco de dados. Ao autorizar a análise do seu prontuário, você não terá prejuízos e/ou desconfortos.

Mesmo após a sua autorização, terá o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, independente do motivo e sem prejuízo do atendimento fornecido pelo pesquisador. Você não terá nenhuma despesa e também nenhuma remuneração. Conseqüentemente a vantagem de sua participação é apenas de caráter científico ao auxiliar este estudo que proporcionará maiores conhecimentos acerca da Coinfecção Viral como Elemento Imunomodulatório na Tuberculose Pulmonar, Extrapulmonar e no Lúpus Eritematoso Sistêmico.

Os resultados da pesquisa serão analisados e divulgados, porém sua identidade será mantida em sigilo para sempre. Se você quiser saber mais detalhes e os resultados da pesquisa, faça contato com o pesquisador Luiz Fernando de Souza Passos no ambulatório Araújo Lima à quinta-feira pela tarde; ou com a pesquisadora Isabela Carvalho Araújo pelo telefone (92) 81797359 ou pelo e-mail: isabela_carvalho_@hotmail.com

Eu, _____, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa de minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Estou recebendo uma cópia deste documento, assinada, que vou guardar.

Assinatura do participante

Dr. Luiz Fernando de Souza Passos (CRM-AM)

Data: ___/___/___

ou



Impressão do dedo polegar. Caso não saiba assinar

3. PROTOCOLO DE DADOS/ PACIENTES LÚPICOS



PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

PROJETO COINFECÇÃO VIRAL, TB E LES



PROTOCOLO DE COLETA DE DADOS/ PACIENTES LÚPICOS

UFAM

Data: ___/___/___

IDENTIFICAÇÃO: Nome: _____

Sexo: ___ Data de Nasc.: ___/___/___ Local nascimento: _____ Raça: _____

Endereço: _____ Tel: _____

DADOS DO LÚPUS:

Ano do diagnóstico: _____

Critérios ACR:

~~rash~~ malar () fotossensibilidade () rash discóide () úlcera de palato () artrite ()

serosite () Rim () Neuro () Hemato () FAN () Imuno ()

Envolvimentos específicos: (1) Sim, atual (2) Sim, passado (3) Nunca teve

Rim grave: () Neuro grave: () AHAI: () PTI: () SAF: ()

Sjögren associado: () Overlap: ESP () AR () DM () Sínd.Mista ()

Atividade: SLEDAI (0- 105): _____ Hipocomplementenemia atual: (S)/(N)/(NP).

Anti DNA atual: (S)/(N)/(NP) Atividade cutâneo - articular (S)/(N)

Atividade renal (S)/(N) Atividade neurológica (S)/(N) Atividade hematológica (AHAI, PTI): (S)/(N)

Dados imunológicos: Padrão do FAN: _____ Título do FAN: _____

(1) Sim, atual. (2) Sim, passado. (3) Negativo. (4) Não testado.

Anti- DNA () Anti-Sm () Anti-Ro () Anti-La ()

Anti-RNP () Anti-cardiolipina () Anti-HIV () Anti-HCV ()

Anti-HBV () Anti-CMV () IgG ou IgM Anti-toxoplasma () Anti-rubéola ()

Dados da Terapia:

Atual Pred: Zero () <10 () 10-39 () 40 ou > ()

(1) Sim, atual. (2) Sim, passado. (3) Nunca.

() Clq/ hidrxClq () MFM () AZA () MTX () CYF () Talidomida

() Rituximab () Anticonvulsivante () anticoagulante

Outros Dados:

Diabetes: (S)/(N)

Hipertensão: (S)/(N)

Doença da tireóide: (S)/(N)

Fibromialgia: (S)/(N)

TB: () Atual, em tratamento () Passado () Nunca

Zoster: () Já teve () Não sabe () Não teve

Fumante: () Sim, atual () Sim, passado () Nunca

RESULTADOS VIRAIS:

1) CMV:

2) EBV:

3) B19:

4) HTLV 1/2